

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 2 日 (02.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/080817 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 5/02, (74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591 大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMMビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/03575
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 25 日 (25.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2002-84414 2002 年 3 月 25 日 (25.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐川 裕章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津市 西渋川二丁目 6-3 2 Shiga (JP). 出野 美津子 (IDENO, Mitsuko) [JP/JP]; 〒616-8176 京都府 京都市 右京区 太秦 乾町 2 8 番地 7 Kyoto (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府 宇治市 南陵町 1-1-1 5 O Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CYTOTOXIC LYMPHOCYTE

(54) 発明の名称: 細胞傷害性リンパ球の製造方法

(57) Abstract: A process for producing cytotoxic lymphocytes, characterized by comprising a step of performing at least any one of induction, maintenance and dilation culturing of cytotoxic lymphocytes in the presence of fibronectin, a fragment thereof or a mixture of these.

(57) 要約: 本発明は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法に関する。

明 細 書

細胞傷害性リンパ球の製造方法

技術分野

本発明は、医療分野において有用な、細胞傷害性リンパ球を取得する方法に関する。

背景技術

生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリンパ球（以下、B細胞と記載することがある）とTリンパ球（以下、T細胞と記載することがある）という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

T細胞は、CD（Cluster Designation）4マーカーを有し、主に抗体産生の補助や種々の免疫応答の誘導に関与するヘルパーT細胞（以下、 T_H と記載する）、CD8マーカーを有し、主に細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞〔 T_C ；細胞傷害性Tリンパ球（cytotoxic T lymphocyte）、キラーT細胞とも呼ばれる。以下、CTLと記載することがある〕に亜分類される。腫瘍細胞やウイルス感染細胞等を認識して破壊、除去するのに最も重要な役割を果たしているCTLは、B細胞のように抗原に対して特異的に反応する抗体を産生するのではなく、標的細胞膜表面上に存在する主要組織適合複合体〔MHC：ヒトにおいてはヒト白血球抗原（HLA）と称することもある〕クラスI分子に会合した標的細胞由来の抗原（抗原ペプチド）を直接認識して作用する。この時、CTL膜表面のT細胞レセプター（以下、TCRと称す）が前述した抗原ペプチドおよびMHCクラ

ス I 分子を特異的に認識して、抗原ペプチドが自己由来のものなのか、あるいは、非自己由来のものなのかを判断する。そして、非自己由来と判断された標的細胞は C T L によって特異的に破壊、除去される。

近年、薬剤治療法や放射線治療法のように患者に重い肉体的負担がある治療法が見直され、患者の肉体的負担が軽い免疫治療法への関心が高まっている。特に免疫機能が正常なヒト由来のリンパ球から目的とする抗原に対して特異的に反応する C T L を生体外（イン・ビトロ、in vitro）で誘導した後、もしくは誘導を行わず、リンパ球を拡大培養し、患者へ移入する養子免疫療法の有効性が注目されている。例えば、動物モデルにおいて養子免疫療法がウイルス感染および腫瘍に対して有効な治療法であることが示唆されている〔グリーンバーグ（Greenberg, P. D.）著、アドバンセズ・イン・イムノロジー（Advances in Immunology）、1992年発行；ロイゼル P. ら（Reusser P., et al.）、ブラッド（Blood）、第78巻、第5号、第1373～1380頁（1991）〕。この治療法では C T L の抗原特異的傷害活性を維持もしくは増強させた状態でその細胞数を維持あるいは増加させることが重要である。

上記のような養子免疫療法において、治療効果を得るためには一定量以上の細胞数の細胞傷害性リンパ球を投与する必要がある。すなわち、イン・ビトロでこれらの細胞数を短時間に得ることが最大の問題であるといえる。

C T L の抗原特異的傷害活性を維持および増強するためには、C T L について抗原に特異的な応答を誘導する際に、目的とする抗原を用いた刺激を繰り返す方法が一般的である。しかし、通常、この方法では最終的に得られる C T L 数が減少し、十分な細胞数が得られない。

疾病の治療に有効な T 細胞を調製する方法としては、例えば、高濃度の I L - 2 を用いて誘導した腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を用いる養子免疫療法〔ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン（N. Engl. J. Med.）、第316巻、第1310～1321頁（1986）；ローゼンバーグ S. A. ら（Rosenberg S. A., et

al.)、N. Engl. J. Med.、第319巻、第25号、第1676～1680頁(1988)；ホ
M. ら(Ho M., et al.)、Blood、第81巻、第8号、第2093～2101頁(1993)〕
が知られている。

次に、抗原特異的なCTLの調製に関しては、自己CMV感染線維芽細胞とイ
ンターロイキン-2(IL-2)〔リデル S. A. ら(Riddell S. A., et al
.)、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.)、第146巻、第8号、第27
95～2804頁(1991)〕、あるいは抗CD3モノクローナル抗体(抗CD3mAb
)とIL-2〔リデル S. A. ら(Riddell S. A., et al.)、ジャーナル・
オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods)、第128巻、第2号、
第189～201頁(1990)〕を用いて、それぞれCMV特異的CTLクローンを単離
ならびに大量培養する方法が報告されている。

さらに、国際公開第96/06929号パンフレットにはREM法(rapid expansion
method)が開示されている。このREM法は、抗原特異的CTLおよびT_Hを含
むT細胞の初期集団を短期間で増殖(Expand)させる方法である。つまり
、個々のT細胞クローンを増殖させて大量のT細胞を提供可能であり、抗CD3
抗体、IL-2、並びに放射線照射により増殖性をなくしたPBMC(peripher
al blood mononuclear cell、末梢血単核細胞)とエプスタイン-バールウイル
ス(Epstein-Barr virus、以下EBVと略す)感染細胞とを用いて抗原特異的C
TL数を増加させることが特徴である。

また、国際公開第97/32970号パンフレットには改変REM法が開示されてお
り、当該方法はPBMCとは区別されるT細胞刺激成分を発現する分裂していない哺乳
動物細胞株をフィーダ細胞として使用し、PBMCの使用量を低減させる方法である
。

リンフォカイン活性化キラー細胞(LAK細胞)は、リンパ球を含む末梢血液
(末梢血白血球)や臍帯血、組織液等にIL-2を加えて、数日間試験管内で培
養することにより得られる細胞傷害活性を持つ機能的細胞集団である。この際、

抗CD3抗体を加えて培養することにより、さらにLAK細胞の増殖は加速する。このようにして得られたLAK細胞は非特異的にさまざまながん細胞やその他のターゲットに対して傷害活性を有する。LAK細胞も上記CTLと同様に、養子免疫療法に使用される。

上記のとおり、細胞傷害性リンパ球、例えばCTL、LAK細胞、TIL等を取得する工程においてはIL-2の利用を欠かすことができない。IL-2が細胞表面のインターロイキン-2レセプター(IL-2R)に結合することにより細胞はさらに活性化される。また、IL-2Rはリンパ球の活性化マーカーとして知られている。これらの点において、細胞表面のIL-2Rの発現を上昇させることは重要である。また、CTLの誘導においては、抗原による刺激に供されたCTLの前駆細胞がCTLとして誘導される効率を向上させること、すなわち、誘導後の細胞群におけるCD8陽性細胞の割合(比率)を向上させることが重要である。

フィブロネクチンは動物の血液中、培養細胞表面、組織の細胞外マトリックスに存在する分子量25万の巨大な糖タンパク質であり、多彩な機能を持つことが知られている。そのドメイン構造は7つに分けられており(以下、第1図参照)、またそのアミノ酸配列中には3種類の類似の配列が含まれており、これら各配列の繰返しで全体が構成されている。3種類の類似の配列はI型、II型、III型と呼ばれ、このうち、III型はアミノ酸残基71~96個のアミノ酸残基で構成されており、これらのアミノ酸残基の一致率は17~40%である。フィブロネクチン中には14のIII型の配列が存在するが、そのうち、8番目、9番目、10番目(以下、それぞれIII-8、III-9、III-10と称する。)は細胞結合ドメインに、また12番目、13番目、14番目(以下、それぞれIII-12、III-13、III-14と称する。)はヘパリン結合ドメインに含有されている。また、III-10にはVLA(very late activation antigen)-5結合領域が含まれており、この

コア配列はR G D Sである。また、ヘパリン結合ドメインのC末端側にはI I I C Sと呼ばれる領域が存在する。I I I C Sには25アミノ酸からなるV L A-4に対して結合活性を有するC S-1と呼ばれる領域が存在する。(Deane F. M omer, FIBRONECTIN, ACADEMIC PRESS INC., p1-8 (1988)、Kimizuka F. et al., J. Biochem. 110 p284-291 (1991)、Hanenberg H. et al., Human Gene Therapy 8 p2193-2206 (1997))

発明の開示

本発明の目的は、医療への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持した細胞傷害性リンパ球を取得する方法を提供することにある。

すなわち、本発明は、

[1] フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法、

[2] 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、インターロイキン-2レセプターを高発現するものである前記[1]記載の方法、

[3] 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、CD8陽性細胞を高比率で含有するものである前記[1]記載の方法、

[4] 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、細胞傷害活性が高く維持されたものである前記[1]～[3]いずれか1項に記載の方法、

〔5〕 フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固相に固定化されてなるものである前記〔1〕～〔4〕いずれか1項に記載の方法、

〔6〕 固相が細胞培養用器材または細胞培養用担体である前記〔5〕記載の方法、

〔7〕 細胞培養用器材がシャーレ、フラスコまたはバッグであり、細胞培養用担体がビーズ、メンブレンまたはスライドガラスである前記〔6〕記載の方法、

〔8〕 細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つをフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含む培地中に行なう前記〔1〕～〔4〕いずれか1項に記載の方法、

〔9〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである前記〔1〕～〔8〕いずれか1項に記載の方法、

〔10〕 フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである前記〔9〕記載の方法、

〔11〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである前記〔9〕記載の方法、

〔12〕 細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中に行なう前記〔1〕記載の方法であって、

(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、 $1 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ である、および

(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、 $1 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ で

ある、

のいずれかの条件を満たす方法、

〔13〕 希釈する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含しない前記〔12〕記載の方法、

〔14〕 前記〔1〕～〔13〕いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球、

〔15〕 前記〔1〕～〔13〕いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬、

〔16〕 フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有することを特徴とする細胞のインターロイキン-2レセプター発現増強剤、

〔17〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである前記〔16〕記載のインターロイキン-2レセプター発現増強剤、

〔18〕 フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである前記〔17〕記載のインターロイキン-2レセプター発現増強剤、

〔19〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである前記〔17〕記載のインターロイキン-2レセプター発現増強剤、

〔20〕 フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有することを特徴とするリンパ球中のCD8陽性細胞の比率向上剤、

〔21〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表さ

れるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである前記〔20〕記載のCD8陽性細胞の比率向上剤、

〔22〕 フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである前記〔21〕記載のCD8陽性細胞の比率向上剤、

〔23〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである前記〔21〕記載のCD8陽性細胞の比率向上剤、

〔24〕 フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有することを特徴とする細胞傷害性リンパ球における細胞傷害活性の向上剤または維持剤、

〔25〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである前記〔24〕記載の細胞傷害活性の向上剤または維持剤、

〔26〕 フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである前記〔25〕記載の細胞傷害活性の向上剤または維持剤、

〔27〕 フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである前記〔25〕記載の細胞傷害活性の向上剤または維持剤、

〔28〕 フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含む、細胞傷害性リンパ球でのインターロイキン-2レセプターの発現を増大する方法、

〔29〕 フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含む、細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率を向上する方法、

〔30〕 フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含むことを特徴とする細胞傷害性リンパ球において細胞傷害活性を向上または維持させる方法、

〔31〕 細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む前記〔1〕～〔13〕いずれか1項に記載の方法、並びに

〔32〕 外来遺伝子をレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入する前記〔31〕記載の方法、に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、フィブロネクチンのドメイン構造を示す模式図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、フィブロネクチンおよび／またはそのフラグメントの存在下に調製された細胞傷害性リンパ球において、細胞傷害活性が高く維持され、IL-2Rの発現量が有意に上昇し、およびCD8陽性細胞の比率が向上することを見出し、完成するに至ったものである。

なお、本明細書において細胞傷害性リンパ球の製造とは、当該細胞の誘導（活性化）、維持、拡大培養の各工程、もしくはこれらを組み合わせた工程を包含する工程を指す。また、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造を、細胞傷害性リンパ球の培養とも称する。

以下、本発明を具体的に説明する。

（１）本発明に使用されるフィブロネクチン、およびそのフラグメント

本明細書中に記載のフィブロネクチンおよびそのフラグメントは、天然から得られたもの、または人為的に合成されたもののいずれでもよい。フィブロネクチンおよびそのフラグメントは、例えば、ルオスラーティ E. ら [Ruoslahti E., et al., ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 第256巻、第14号、第7277～7281頁 (1981)] の開示に基づき、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。ここで、本明細書に記載された実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントとは、これらが天然においてフィブロネクチンと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。上記のフィブロネクチンおよびそのフラグメントは、それぞれ単独で、もしくは複数の種類のものを混合して本発明に使用することができる。

本発明に使用できるフィブロネクチンフラグメント、ならびに該フラグメントの調製に関する有用な情報は、キミヅカ F. ら [Kimiduka F., et al., ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 第110巻、第284～291頁 (1991)]、コーンブリット A. R. ら [Kornbriht A. R., et al., EMBO ジャーナル (EMBO J.), 第4巻、第7号、1755～1759 (1985)]、およびセキグチ K. ら [Sekiguchi K., et al., バイオケミストリー (Biochemistry), 第25巻、第17号、4936～4941 (1986)] 等より得ることができる。

本発明においては、フィブロネクチンフラグメントとしては、例えば、少なくとも I I I - 8（配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列）、I I I - 9（

配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列)、I I I - 1 0 (配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列)、I I I - 1 2 (配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列)、I I I - 1 3 (配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列)、I I I - 1 4 (配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列)、およびC S - 1 (配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列)のいずれかの領域を構成するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド(第1図参照)が例示される。

また、当該フラグメントとしては、細胞接着活性および/またはヘパリン結合活性を有するものが好適に使用できる。細胞接着活性は、本発明で使用されるフラグメント(その細胞結合ドメイン)と細胞との結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、このような方法には、ウィリアムズ D. A. らの方法[Williams D. A., et al., ネイチャー (Nature)、第352巻、第438~441頁(1991)]が含まれる。当該方法は、培養プレートに固定化したフラグメントに対する細胞の結合を測定する方法である。また、ヘパリン結合活性は、本発明に使用されるフラグメント(そのヘパリン結合ドメイン)とヘパリンとの結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、上記のウィリアムズ D. A. らの方法において、細胞に換えてヘパリン、例えば標識ヘパリンを使用することにより、同様の方法でフラグメントとヘパリンとの結合の評価を行うことができる。

さらにフィブロネクチンのフラグメントとしては、C - 2 7 4 (配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)、H - 2 7 1 (配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列)、H - 2 9 6 (配列表の配列番号10で表されるアミノ酸配列)、CH - 2 7 1 (配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列)、CH - 2 9 6 (配列表の配列番号12で表されるアミノ酸配列)、またはC - C S 1 (配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列)より選択されるポリペプチドが例示される。

上記のCH - 2 7 1、CH - 2 9 6、C - 2 7 4、C - C S 1の各フラグメン

トはVLA-5に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。また、C-CS1、H-296、CH-296はVLA-4に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。さらに、H-271、H-296、CH-271およびCH-296はヘパリン結合ドメインを有するポリペプチドである。

本発明においては、上記の各ドメインが改変されたフラグメントも使用することができる。フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインは3つのIII型配列（III-12、III-13、III-14）によって構成されている。前記III型配列のうちの一つもしくは二つを欠失したヘパリン結合ドメインを含むフラグメントも本発明に使用することが可能である。例えば、フィブロネクチンの細胞結合部位（VLA-5結合領域、Pro1239～Ser1515）と一つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-89（配列表の配列番号14で表されるアミノ酸配列）、CHV-90（配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列）、CHV-92（配列表の配列番号16で表されるアミノ酸配列）、あるいは二つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-179（配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列）、CHV-181（配列表の配列番号18で表されるアミノ酸配列）が例示される。CHV-89、CHV-90、CHV-92はそれぞれIII-13、III-14、III-12を含むものであり、CHV-179はIII-13とIII-14を、CHV-181はIII-12とIII-13をそれぞれ含んでいる。

また、上記の各フラグメントにさらにアミノ酸を付加したフラグメントも本発明に使用することができる。当該フラグメントは、例えば、後述の製造例に記載のH-275-Cysの製造方法に準じて上記各フラグメントに所望のアミノ酸を付加することにより製造可能である。例えば、H-275-Cys（配列表の配列番号19で表されるアミノ酸配列）は、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインを有し、かつC末端にシステイン残基を有するフラグメントである。

なお、本発明に使用されるフラグメントとしては、本発明の所望の効果が得られる限り、上記に例示した天然のフィブロネクチンのアミノ酸配列の少なくとも一部を含むフラグメントと同等な機能を有する、当該フラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるものであってもよい。

アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであるのが好ましい。例えば、アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの持つ性質（例えば、疎水性、親水性、電荷、pK等）を実質的に変化させない範囲の保存的なものである。例えば、アミノ酸の置換は、①グリシン、アラニン；②バリン、イソロイシン、ロイシン；③アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；④セリン、スレオニン；⑤リジン、アルギニン；⑥フェニルアラニン、チロシンの各グループ内での置換であり、アミノ酸の欠失、付加、挿入は、ポリペプチドにおけるそれらの対象部位周辺の性質に類似した性質を有するアミノ酸の、対象部位周辺の性質を実質的に変化させない範囲での欠失、付加、挿入である。

また、「同等な機能を有する」とは、フィブロネクチンフラグメントが有する、(i)細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性の維持機能、(ii)IL-2Rの発現量の増強機能、または(iii)CD8陽性細胞の比率向上機能の少なくともいずれかの機能を有することをいう。アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントが、それらの機能を有するかについては後述の実施例に記載の方法に準じて適宜確認することができる。また、アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとしては、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものが好適である。細胞接着活性およびヘパリン結合活性は、それらの前記活性測定方法に準じて評価することができる。

アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとして、例えば、2つの異なるドメイン間にリンカーとして1以上のアミノ酸が挿入されたフラ

グメントも本発明に使用することができる。

なお、フィブロネクチン自体についても同様、そのポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、少なくとも前記(i)～(iii)のいずれかの機能を有するポリペプチドを、本発明において使用することができる。

本明細書中に記載のフィブロネクチンフラグメントは、例えば、米国特許第5,198,423号明細書の記載に基づいて遺伝子組換え体より製造することもできる。例えば、上記のH-271（配列番号9）、H-296（配列番号10）、CH-271（配列番号11）、CH-296（配列番号12）の各フラグメントならびにこれらを取得する方法は当該特許明細書に詳細に記載されている。また、上記のC-274（配列番号8）フラグメントは米国特許第5,102,988号明細書に記載された方法により得ることができる。さらに、C-CS1（配列番号13）フラグメントは日本特許第3104178号明細書に記載された方法により得ることができる。上記CHV-89（配列番号14）、CHV-90（配列番号15）、CHV-179（配列番号17）の各フラグメントは、日本特許第2729712号明細書に記載された方法により得ることができる。また、CHV-181（配列番号18）フラグメントは国際公開第97/18318号パンフレットに記載された方法に準じて得ることができる。CHV-92（配列番号16）フラグメントは、日本特許第2729712号明細書および国際公開第97/18318号パンフレットを参照し、それらの文献に記載されたプラスミドに基づいて定型的にプラスミドを構築し、該プラスミドを用いて遺伝子工学的に取得することができる。

これらのフラグメントまたはこれらフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは、〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに下記受託番号のもとで寄託された微生物を用いて製造する、あるいは各微生物の保持するプラスミドを公知の方法により改変することにより製造することができる；

FERM BP-2264 (H-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年1月30日)、
FERM BP-2800 (CH-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年5月12日)、
FERM BP-2799 (CH-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年5月12日)、
FERM BP-7420 (H-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年5月12日)、
FERM BP-1915 (C-274をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1988年6月17日)、
FERM BP-5723 (C-CS1をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1990年3月5日)、
FERM P-12182 (CHV-89をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1991年4月8日)、
FERM P-12183 (CHV-179をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1991年4月8日)。

フィブロネクチンは巨大な糖タンパク質であるため、天然起源のタンパク質を調製して使用することは産業上および医薬品製造上、必ずしも容易ではない。さらにフィブロネクチンは生体内では血しょう中に多量に存在しており、血液製剤として血しょうから得られるフィブロネクチンを使用する場合は、フィブロネクチン以外の成分のコンタミネーションの恐れがあり、安全面においても問題あることも考えられる。また、フィブロネクチンは多機能タンパク質であることから、その使用の状況によっては、本発明の方法に効果を示す領域とは異なる領域に起因する不都合が起こることも考えられる。これらのことから、本発明においては、入手、取り扱いの容易さ、安全面の観点から、好適にはフィブロネクチンフラグメント、さらに好適には前記のようにして得られる組換えフィブロネクチンフラグメントを使用することができる。さらに、後述するリンパ球の拡大培養率の向上、拡大培養されたリンパ球におけるIL-2Rの発現量の上昇、および拡大培養されたリンパ球集団中のCD8陽性細胞の比率の向上等の効果を示すことができるフィブロネクチンフラグメントが特に好適に使用できる。また、本発明に使用されるフィブロネクチンフラグメントの分子量としては、特に限定はないが、好適には1～200kD、より好適には5～190kD、さらに好適には10～180kDである。

(2) 本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法

以下、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法について具体的に説明する。本発明の方法は、前記したフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう細胞傷害性リンパ球の製造方法である。

本明細書において細胞傷害性リンパ球とは細胞傷害性リンパ球を含有する細胞群を意味する。なお、狭義には前記細胞群に含有されている細胞傷害性リンパ球のみを示すことがある。また、本発明において細胞傷害性リンパ球の製造とは、本発明の細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞からの細胞傷害活性を有するリンパ球への誘導、細胞傷害性リンパ球の維持、細胞傷害性リンパ球および／または前駆細胞を用いた細胞傷害性リンパ球の拡大培養のいずれをも包含するものである。

本発明の細胞傷害性リンパ球としては、特に限定するものではないが、例えば抗原特異的な細胞傷害活性を有する、細胞傷害性T細胞（CTL）、リンフォカイン活性化キラー細胞（LAK細胞）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、NK細胞等が挙げられる。

本発明において、細胞傷害性リンパ球になり得る、すなわち、該リンパ球への分化能を有する前駆細胞としては、PBMC、NK細胞、ナイーブ細胞、メモリー細胞、造血幹細胞、臍帯血単核球等が例示される。また、血球系細胞であれば本発明において前駆細胞として使用できる。これらの細胞は生体から採取されたものをそのままもしくは凍結保存したもののいずれも使用することができる。なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法では、前記細胞を含有する材料、例えば、末梢血液、臍帯血等の血液や、血液から赤血球や血漿等の成分を除去したもの、骨髓液等を使用することができる。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物から選択される有効成分の存在下に細胞傷害性リンパ

球を製造することを1つの大きな特徴とする。

本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および／または拡大培養は、通常、本発明の前記有効成分の存在下に、所定の成分を含む培地中で行なわれる。

例えば、本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導もしくは拡大培養を意図する場合、本発明において使用される培養開始時の細胞（細胞傷害性リンパ球および／または前駆細胞）数としては、特に限定はないが、例えば $1 \sim 1 \times 10^8$ cells/ml が好適である。また、培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができる。例えば、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法において使用される培地には特に限定はなく、細胞傷害性リンパ球、その前駆細胞の維持、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地であってもよい。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでいてもよい。好適には、IL-2 を含有する培地が本発明に使用される。IL-2 の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には $0.01 \sim 1 \times 10^5$ U/ml、より好適には $0.1 \sim 1 \times 10^4$ U/ml である。

また、抗CD3抗体をさらに含有する培地中で細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞を共培養することもできる。抗CD3抗体の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば $0.01 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ が好適である。抗CD3抗体はリンパ球上のレセプターを活性化する目的で添加することができる。また、この他、レクチン等のリンパ球刺激因子を添加することもできる。当該成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

なお、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシ

シャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材（開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む）、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。それらの固相の材質は細胞培養に使用可能なものであれば特に限定されるものではない。該成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。前記担体は、細胞培養時に細胞培養用器材中の培養液に浸漬して使用される。前記成分を前記担体に固定化する場合、該担体を培地に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

いずれの場合も前記成分の固定化は、公知の方法、例えば、後述するフィブロネクチンフラグメントの固定化方法に準じて行なうことができる。

さらに、国際公開第02/14481号パンフレットに記載された、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞の誘導に有効な酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖およびそれらの塩からなる群より選択される化合物や、下記（A）～（D）から選択される物質を前記成分と共に用いてもよい。

（A）CD44に結合活性を有する物質

（B）CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

（C）成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質

（D）成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

前記CD44に結合活性を有する物質としては、例えばCD44リガンドおよ

び／または抗CD44抗体が例示される。CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素の阻害剤が挙げられる。成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質としては、例えば成長因子に結合活性を有し、成長因子と複合体を形成することにより成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質、もしくは成長因子レセプターに結合活性を有し、成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質が挙げられる。さらに、成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素の阻害剤が挙げられる。これらの成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。また、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、前記のような適切な固相に固定化して使用してもよい。

。なお、上記の各種物質は単独で、もしくは2種以上混合して用いることができる。

本発明において前記有効成分の存在下とは、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持または拡大培養を行なう際に、前記有効成分がその機能を発揮し得る状態で存在することをいい、その存在状態は特に限定されるものではない。例えば、有効成分を使用する培地に溶解させる場合、共培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定するものではないが、例えば、好ましくは $0.01 \sim 10000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは $0.1 \sim 10000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。なお、有効成分は、このように培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材（開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む）、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。培養された細胞傷害性リンパ球を生体に投与する観点からは、特に限定はないが、前記有効成分を固定化して使用することが望

ましい。

前記の種々の成分や、本発明の有効成分を固相に固定化しておけば、本発明の方法により細胞傷害性リンパ球を得た後、該リンパ球と固相とを分離するのみで、有効成分等と該リンパ球とを容易に分離することができ、該リンパ球への有効成分等の混入を防ぐことができる。

本発明の有効成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。有効成分を前記担体に固定化する場合、該担体を培地に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

例えば、フィブロネクチンのフラグメントの固定化は、国際公開第97/18318号パンフレット、ならびに国際公開第00/09168号パンフレットに記載の方法により実施することができる。

本発明の製造方法によって得られた細胞傷害性リンパ球について I L - 2 R の発現量を測定すると、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか 1 つを行なった細胞傷害性リンパ球に比較して有意な I L - 2 R 発現量の増加が認められる。ここで、I L - 2 R 発現量は公知の方法、例えば、抗 I L - 2 R 抗体を使用して測定することができる。

上記のように、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球は I L - 2 R の発現量が増加している。I L - 2 R は活性化 T 細胞表面に発現する活性化マーカーであり、この分子の発現に伴い、サイトカイン産生、細胞傷害活性、増殖活性等が活性化される。よって、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球

は高い機能を有する細胞群である。

また、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は、IL-2Rの発現量が増加していることから、培地中に添加されたIL-2、あるいは細胞傷害性リンパ球の前駆細胞、リンパ球自体もしくは共存するその他の細胞が産生したIL-2による刺激に対する感受性が向上している。このため、IL-2の少ない環境下（例えば体内等）でも自ら活性化することかできる。

さらに、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球では、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものに比べてCD8マーカーを有する（CD8陽性）細胞の存在する比率が高い。このことは、例えば、①CD8陽性細胞はインターフェロン- γ 等のサイトカインを産生して、免疫賦活を引き起こし、ヘルパーT細胞バランスをTh1系にする、②CD8陽性細胞は細胞性免疫担当細胞であり、ウィルスや腫瘍細胞等の異物を効率よく排除することができる、③CD8陽性細胞を得る場合は、従来はマグネットビーズやフローサイトメーターでCD8陽性細胞を精製していたが、本発明の方法では培養しながらCD8陽性細胞をエンリッチにすることができる、④CD8陽性細胞比が多いことから、CTLを誘導する際の前駆細胞としての使用に適している、⑤CD8陽性細胞比の少ない細胞集団からでも、CD8陽性細胞比率を高めながら培養することができる、等の利点がある。よって、本発明の方法は細胞傷害性リンパ球の調製において極めて有用である。

なお、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率は、特に限定するものではないが、例えば抗CD8抗体を使用して測定することができる。

また、本発明の方法により調製された細胞傷害性リンパ球、特にCTLについては培養後の細胞を長期間にわたって維持、あるいはこれを増殖させても、従来観察されたような細胞傷害活性の著しい低下がないという優れた性質を有してい

る。すなわち、該細胞傷害性リンパ球は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、細胞傷害活性が高く維持されたものである。従って、培養された細胞傷害性リンパ球をクローン化することにより、安定した細胞傷害活性を有するリンパ球として維持することもできる。また、誘導されたCTLに抗原、各種サイトカイン、抗CD3抗体刺激を与えることにより増殖させ、拡大培養することができる。この細胞傷害性リンパ球の維持、拡大培養には、特に限定はなく、公知の方法を用いることができる。

上記の細胞傷害性リンパ球の維持とは、細胞傷害性リンパ球を細胞傷害活性を保ったままで維持することをいう。その際の培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を適用することができる。例えば、37℃、5%CO₂等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。使用される培地や、同時に使用されるその他の成分等は前記と同様である。

本発明の方法における細胞傷害性リンパ球の維持および拡大培養は、本発明の有効成分、すなわちフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地中で細胞傷害性リンパ球をそれぞれ継続培養および拡大培養することを1つの大きな特徴とする。拡大培養によれば、細胞傷害性リンパ球の有する細胞傷害活性を維持させた状態でその細胞数を増加させることができる。すなわち、本発明の方法は、1つの態様として、細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を提供する。

本発明の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法において、その培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5%CO₂等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。使用される培地や、同時に使用されるその他の成分等は前記と同様である。

本発明の拡大培養方法によれば、例えばCTLの拡大培養の場合、14日間の拡大培養によって100～1000倍に細胞数の増加したCTLを得ることができる。また、LAK細胞の拡大培養の場合の一例としては、7日間の培養で約200倍、9日間の培養で1000倍に増加したLAK細胞を得ることができる。さらに、こうして得られた細胞傷害性リンパ球、特にCTLについては従来の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法、例えばREM法や改変REM法で得られたものに比べてより高い細胞傷害活性を保持している。このような本発明の効果は、本発明の方法で拡大培養されたCTL等の有する細胞傷害活性を後述の実施例に記載の方法により測定し、確認することができる。

さらに、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法の特徴として、低細胞数から培養を開始することが可能である。養子免疫療法を行うためには大量のリンパ球が必要となるが、患者から大量のリンパ球を取得することは困難である。また、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、使用する細胞数に応じた適切な培養面積の細胞培養用器材の選択や、適切な培地量での培養が必要となる。すなわち、通常は細胞培養用器材における培養面積〔すなわち、培地に接触している器材表面部分の面積（ cm^2 ）〕に対する細胞量（個数）は $1 \times 10^6 \text{ cells} / \text{cm}^2$ 以上、細胞濃度は $1 \times 10^6 \text{ cells} / \text{ml}$ 以上の高密度で培養が開始され、これ以下の細胞量条件では、拡大培養率〔拡大培養後の細胞数に対する拡大培養後の細胞数の比（拡大培養後の細胞数／拡大培養前の細胞数）〕が非常に低くなり、大量の細胞傷害性リンパ球を得るまでに長期の培養期間を要する。よって、一般的には、例えば、小さな細胞培養用器材を用いて培養を開始した後、段階的に大きなスケールの細胞培養用器材を使用する、もしくは細胞培養用器材の数を増やして希釈操作を繰り返す等の方法により、大量のリンパ球を製造するのが現状である。このように、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、複数の培養系を必要とする。

本発明の方法により、少量の細胞量より開始された場合でも細胞培養用器材の

大きさに関わらず、高い拡大培養率で培養を行うことができる。よって、従来のような面倒な細胞培養用器材の交換や希釈操作は不要となる。すなわち、本発明の方法によれば、1つの細胞培養用器材を用いた培養操作により、換言すれば、1つの培養系により、十分な細胞傷害性リンパ球の拡大培養を行なうことができる。よって、本発明の方法は、希釈する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含しない細胞傷害性リンパ球の製造方法である。特に、本発明の方法でLAK細胞を拡大培養する場合、大容量の細胞培養用器材にLAK細胞となり得る細胞と培地を添加し、それ以降はIL-2を添加するのみでLAK細胞の拡大培養を行うことが可能である。簡便な操作で大量のLAK細胞を得ることができる点において、本発明は非常に有用である。この際、使用する本発明の有効成分としては、より高い拡大培養率を得るという観点から、好適にはフィブロネクチンフラグメントが使用できる。このように、本発明の方法によれば、短時間に必要量の細胞傷害性リンパ球を得ることができる。

例えば、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを、本発明の有効成分の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で低細胞数から開始する場合、培養開始時において、下記(a)および(b)から選択される条件を満たす細胞量を使用して行うことができる。

(a) 使用する細胞培養用器材における培養面積に対する細胞量の比率が、好適には $1 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、より好適には $10 \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ である。

(b) 培地中の細胞の濃度が、好適には $1 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 、より好適には $10 \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ である。

なお、ここで細胞量とは、細胞傷害性リンパ球および／または前駆細胞の個数をいう。

また、本発明の方法においては、細胞培養用器材の交換や希釈操作の工程を含まない、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを1つの培養系で行なう方法が例示される。

以下、本発明の製造方法によりCTLを製造することを例に説明する。

CTLの誘導は、前記有効成分の存在下、CTLに所望の抗原に対する認識能力を付与するために、適切な抗原提示細胞とともにCTLへの分化能を有する前駆細胞を、例えば、任意の培地中でインキュベート（培養）することにより実施される。前駆細胞はCTLになる前段階で、しかもCTLに分化するように運命付けられている細胞であれば特に限定されるものではなく、例えば末梢血単核球（PBMC）、ナイーブ細胞、メモリー細胞、臍帯血単核球、造血幹細胞等が挙げられる。抗原提示細胞は、T細胞に対して認識すべき抗原を提示する能力を有する細胞であれば特に限定はない。例えば、単球、B細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、線維芽細胞等に所望の抗原を提示させ、本発明に使用することができる。

本発明においては、例えばCTLを製造する際の前駆細胞等の培養条件は一般的な公知の条件〔例えば、カーター J. ら（Carter J., et al.）、イムノロジー（Immunology）、第57巻、第1号、第123～129頁（1986）を参照〕に従えばよい。

また、適切なフィーダ細胞と共培養することもできる。CTLをフィーダ細胞と共培養する場合には、CTL、フィーダ細胞の両者の維持、生育に適した培地であることが望ましい。当該培地としては、市販の培地が使用できる。

本発明の方法に使用されるフィーダ細胞は、抗CD3抗体と協同してCTLを刺激し、T細胞レセプターを活性化するものであれば特に限定はない。本発明には、例えば、PBMCやエプスタインバーウイルスによって形質転換されたB細胞（EBV-B細胞）が使用される。通常、フィーダ細胞は放射線照射のような手段で増殖能を奪ったうえで使用される。なお、フィーダ細胞の培地中にお

ける含有量は公知の方法に従って決定すればよく、例えば、 $1 \times 10^5 \sim 7$ cell s/mlが好適である。

特に好ましい態様においては、フィーダ細胞として、非ウィルス感染細胞、例えば、EBV-B細胞以外のものが使用される。これにより、拡大培養されたCTL中にEBV-B細胞が混在する可能性を排除することができ、養子免疫療法のようなCTLを利用した医療の安全性を高めることが可能となる。

抗原提示細胞は、抗原提示能を有する細胞に抗原ペプチドを付加し、その表面に抗原ペプチドを提示させることにより調製することができる〔例えば、ベンドナレク M. A. ら (Bendnarek M. A., et al.)、J. Immunol.、第147巻、第12号、第4047～4053頁 (1991)を参照〕。また、抗原提示能を有する細胞が抗原を処理 (process) する能力を有している場合には、当該細胞に抗原を負荷することにより、抗原が細胞内に取り込まれてプロセッシングを受け、断片化された抗原ペプチドが細胞表面に提示される。なお、抗原ペプチドを抗原提示能を有する細胞に付加する場合、使用される抗原提示細胞、誘導しようとするCTLのMHC拘束性に合致する抗原ペプチドが使用される。

なお、本発明において使用される抗原は特に限定されるものではなく、例えば、細菌、ウィルスなどの外来性抗原や腫瘍関連抗原 (癌抗原) などの内存性抗原等が挙げられる。

本発明においては、抗原提示細胞は非増殖性とすることが好ましい。細胞を非増殖性とするためには、例えばX線等の放射線照射またはマイトマイシン (mitomycin) 等の薬剤による処理を行えばよい。

本発明における、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物から選択される有効成分の存在下、CTLへの分化能を有する前駆細胞を抗原提示細胞とともにインキュベート (共培養) してCTLを誘導するための一般的な条件は、公知の条件〔例えば、ベンドナレク M. A. ら (Bendnarek M. A., et al.)、J. Immunol.、第147巻、第12号、第4047～4053頁 (1991)を参照〕に従

えばよい。共培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5%CO₂等の条件で培養することができる。この共培養は通常、2～15日程度実施されるが、その間に抗原提示細胞を新たに調製したものに取り替えて再刺激を行ってもよい。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。

本発明の方法により得られるCTLは所望の抗原を特異的に認識する能力を有しており、例えば該抗原を有する細胞を、その細胞傷害活性により特異的に破壊する。このCTLの細胞傷害活性は公知の方法により評価できる。例えば、放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対するCTLの細胞傷害活性を、CTLにより破壊された標的細胞に由来する放射能や蛍光強度を測定することによって評価できる。また、CTLや標的細胞より抗原特異的に遊離されるGM-CSF、IFN- γ 等のサイトカイン量を測定することにより検出することもできる。その他蛍光色素等によって標識された抗原ペプチド-MHC複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えばCTLをCTL特異性抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカーと接触させた後に第2蛍光マーカーとカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をFACS (fluorescence-activated cell sorting) 分析することによりCTLの細胞傷害活性を評価することができる。

なお、本発明のCTLの拡大培養方法については、前記有効成分が、当該方法に使用される培養系に存在しておれば特に限定は無く、上記以外の従来のCTL拡大培養方法において、その培養系に前記有効成分を存在させて、すなわち、本発明の有効成分の存在下に前駆細胞等の培養（例えば、培養に使用される培地に前記有効成分を添加して）が行なわれる態様も本発明に包含される。

次にLAK細胞の培養方法について詳細に説明する。

LAK細胞の培養は、前記有効成分の存在下、IL-2とともにLAK細胞となり得る細胞をインキュベートすることにより実施される。LAK細胞となり得

る細胞としては、特に限定されるものではなく、例えば末梢血単核球（P B M C）、NK細胞、臍帯血単核球、造血幹細胞、これらの細胞を含有する血液成分等が挙げられる。

また、L A K細胞を培養するための一般的な条件は、公知の条件〔例えば、細胞工学、V o l . 1 4、N o . 2、p 2 2 3～2 2 7、（1 9 9 5年）；細胞培養、1 7、（6）、p 1 9 2～1 9 5、（1 9 9 1年）；THE L A N C E T、V o l . 3 5 6、p 8 0 2～8 0 7、（2 0 0 0）；C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y, s u p p l e m e n t 1 7,

U N I T 7. 7を参照〕に従えばよい。共培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、3 7℃、5 % C O₂等の条件で培養することができる。この共培養は通常、2～1 5日程度実施される。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換してもよい。

上記のC T L、L A K細胞の誘導、維持、拡大培養と同様に、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に培養することにより、T I Lについても高い細胞傷害活性を有する細胞群を調製することができる。本発明においては、これらの細胞の活性化操作においてフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を共存させる他には特に限定はなく、前記細胞の培養、活性化に適した培地を使用して実施することができる。フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の使用量、添加方法等については前記方法に準じて適切なものを選択すればよい。

以上の本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法により、細胞傷害活性が高く維持され、I L - 2 Rの発現量が有意に上昇し、C D 8陽性細胞の比率が向上した、医療への使用に適する細胞傷害性リンパ球が得られる。よって、本発明の方法は、その一態様として、さらに、本発明の有効成分の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含む、細胞傷害性リンパ球でのインターロイキン-2レセプターの発現を増大する方法

、本発明の有効成分の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含む、細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率を向上する方法、並びに本発明の有効成分の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含む、細胞傷害性リンパ球において細胞傷害活性を向上または維持させる方法を提供する。

本発明の別の態様として、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有する細胞表面上のIL-2R発現増強剤が提供される。当該増強剤は、有効成分そのもの、またはさらにその他の任意の成分、たとえば、活性化しようとする細胞に適した培地、タンパク質、サイトカイン類（好適にはIL-2）、所望のその他の成分とからなる。また、前記増強剤を含有する培地は細胞傷害性リンパ球でのIL-2R発現増強用培地として使用することができる。前記培地は細胞培養のための基本的な成分を任意に含むものである。なお、前記増強剤およびIL-2R発現増強用培地は、本発明の有効成分を用い、公知の方法に準じて製造することができる。前記増強剤またはIL-2R発現増強用培地中の本発明の有効成分等の含有量は、本発明の所望の効果が得られれば特に限定されるものではなく、例えば、本発明の方法に使用される前記培地中の有効成分等の含有量に準じて、所望により、適宜、決定することができる。また、前記増強剤は、直接生体に投与することにより、生体内細胞上のIL-2Rの発現を増強させることもできる。

また、本発明の別の態様として、フィブロネクチン、そのフラグメントおよびそれらの混合物から選択されるものを有効成分として含有することを特徴とする、培養されたリンパ球集団におけるCD8陽性細胞の比率向上剤が提供される。当該比率向上剤は、有効成分そのもの、またはさらにその他の任意の成分、たとえば、活性化しようとする細胞に適した培地、タンパク質、サイトカイン類（好適にはIL-2）、所望のその他の成分とからなる。また、前記比率向上剤を含

有する培地は細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率向上用培地として使用することができる。前記培地は細胞培養のための基本的な成分を任意に含むものである。なお、前記比率向上剤および比率向上用培地は、本発明の有効成分を用い、公知の方法に準じて製造することができる。前記比率向上剤またはCD8陽性細胞の比率向上用培地中の本発明の有効成分等の含有量は、前記IL-2R発現増強剤等の場合と同様にして、所望により、適宜、決定することができる。また、前記比率向上剤は、直接生体に投与することにより、生体中の細胞傷害性リンパ球の比率を向上させることもできる。

また、本発明の別の態様として、フィブロネクチン、そのフラグメントおよびそれらの混合物から選択されるものを有効成分として含有することを特徴とする細胞傷害性リンパ球における細胞傷害活性の向上剤または維持剤が提供される。当該向上剤または維持剤は有効成分そのもの、またはさらにその他の任意の成分、例えば、活性化しようとする細胞に適した培地、タンパク質、サイトカイン類（好適にはIL-2）、所望のその他の成分とからなる。また前記向上剤または維持剤を含有する培地は細胞傷害性リンパ球における細胞傷害活性の向上用または維持用の培地として使用することができる。前記培地は細胞培養のための基本的な成分を任意に含むものである。なお、向上剤、維持剤、向上用培地および維持用培地は、本発明の有効成分を用い、公知の方法に準じて製造することができる。前記向上剤、維持剤、向上用培地および維持用培地の本発明の有効成分の含有量は、本発明の所望の効果が得られれば特に限定されるものではなく、例えば、本発明の方法に使用される前記培地中の含有量に準じて、所望により、適宜、決定することができる。また、前記向上剤および維持剤は、直接生体に投与することにより、生体中の細胞傷害性リンパ球の活性を向上または維持させることもできる。

さらに、上記の発現増強剤、比率向上剤、細胞傷害活性の向上剤および維持剤はその成分が適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器

材（開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む）、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化された形態のものであってもよい。

上記の細胞傷害性リンパ球の製造方法を用いて得られたリンパ球含有培養物中には、通常、ヘルパーT細胞等の細胞傷害性リンパ球以外の細胞も混在している。しかしながら、本発明により得られたリンパ球含有培養物中には細胞傷害活性を保持するリンパ球が多く含まれているため、該培養物から遠心分離等により該培養物中の細胞を回収し、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球としてそのまま使用することができる。しかも、前記有効成分等を細胞培養用器材等に固定化しておけば、得られた細胞傷害性リンパ球における該成分等の混入の心配はない。

また、さらに該培養物から公知の方法により、細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団（あるいは培養物）を分離し、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球として使用することもできる。すなわち、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、当該方法により得られた培養物から細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団を選択する工程を含むことができる。

細胞傷害性リンパ球を高含有する該細胞集団の選択方法については特に限定はないが、例えば培養物から所望の細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD8抗体を結合させた細胞培養用器材もしくは担体を用いて目的の細胞のみを選択的に回収する方法や、フローサイトメーターを用いる方法が挙げられる。前記担体としては磁気ビーズやカラムが例示される。また、培養物から所望の細胞以外の細胞を吸着除去することにより、目的の細胞を高含有する細胞集団を得ることもできる。例えば、ヘルパーT細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD4抗体を使用し、当該リンパ球培養物からヘルパーT細胞を除去することができる。この工程にはフローサイトメーターを用いることもできる。このようにして得られた細胞傷害性リンパ球を高含有

する細胞集団は、培養物から非選択的に回収された細胞集団と比較してより強い細胞傷害活性を有しており、特に医療分野において好適に使用できる。

さらに本発明は、上記の本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法で得られた、細胞傷害性リンパ球を提供する。当該リンパ球、特にCTLは、高い細胞傷害活性を有しており、長期間にわたる継続培養や拡大培養を行っても細胞傷害活性の低下が少ないという性質を有する。また、本発明は、当該リンパ球を有効成分として含有する医薬（治療剤）を提供する。特に、当該リンパ球を含有する前記治療剤は養子免疫療法への使用に適している。養子免疫療法においては、患者の治療に適した細胞傷害活性を有するリンパ球が、例えば静脈への投与によって患者に投与される。当該治療剤は製薬分野で公知の方法に従い、例えば、本発明の方法により調製された当該リンパ球を有効成分として、たとえば、公知の非経口投与に適した有機または無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合することにより調製できる。なお、治療剤における本発明のリンパ球の含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は公知の養子免疫療法に従って適宜、決定できる。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法においては、当該リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに包含することができる。すなわち、本発明は、その一態様として、細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む細胞傷害性リンパ球の製造方法を提供する。なお、「外来」とは、遺伝子導入対象のリンパ球に対して外来であることをいう。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法、特に細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を行うことにより、培養されるリンパ球のDNA複製能が増強される。よって、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法に、遺伝子の導入工程を包含することにより、遺伝子の導入効率の上昇が期待される。

外来遺伝子の導入手段には特に限定はなく、公知の遺伝子導入方法により適切なものを選択して使用することができる。遺伝子導入の工程は、細胞傷害性リンパ球の製造の際、任意の時点で実施することができる。例えば、前記リンパ球の

誘導、維持および／または拡大培養のいずれかの工程と同時に、あるいは該工程の後に実施するのが、作業効率の観点から好適である。

前記の遺伝子導入方法としては、ウイルスベクターを使用する方法、該ベクターを使用しない方法のいずれもが本発明に使用できる。それらの方法の詳細についてはすでに多くの文献が公表されている。

前記ウイルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知のウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター等が使用される。特に好適には、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスが使用される。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。

レトロウイルスベクターは、当該ベクターが導入される細胞の染色体DNA中に該ベクターに挿入されている外来遺伝子を安定に組み込むことができ、遺伝子治療等の目的に使用されている。当該ベクターは分裂、増殖中の細胞に対する感染効率が高いことから、本発明における、細胞傷害性リンパ球の製造工程、例えば、拡大培養の工程において遺伝子導入を行なうのに好適である。

ウイルスベクターを使用しない遺伝子導入方法としては、本発明を限定するものではないが、例えば、リポソーム、リガンドーポリリジンなどの担体を使用する方法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを使用することができる。この場合にはプラスミドDNAや直鎖状DNAに組み込まれた外来遺伝子が導入される。

本発明において細胞傷害性リンパ球に導入される外来遺伝子には特に限定はなく、前記細胞に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。このような遺伝子としては、例えば、タンパク質（例えば、酵素、サイトカイン類、

レセプター類等) をコードするものの他、アンチセンス核酸やリボザイムをコードするものが使用できる。また、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を同時に導入してもよい。

前記の外来遺伝子は、例えば、適当なプロモーターの制御下に発現されるようにベクターやプラスミド等に挿入して使用することができる。また、効率のよい遺伝子の転写を達成するために、プロモーターや転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列がベクター内に存在していてもよい。また、外来遺伝子を相同組換えにより導入対象のリンパ球の染色体へ挿入することを目的として、例えば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランキング配列の間に外来遺伝子を配置させてもよい。導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子がライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。さらに、その目的に応じて天然の配列に変異が導入された配列を有するものであってもよい。

本発明の方法によれば、例えば、がん等の患者の治療に使用される薬剤に対する耐性に関連する酵素をコードする遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して該リンパ球に薬剤耐性を付与することができる。そのような細胞傷害性リンパ球を用いれば、養子免疫療法と薬剤療法とを組み合わせることができ、従って、より高い治療効果を得ることが可能となる。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、多剤耐性遺伝子 (multidrug resistance gene) が例示される。

一方、前記の態様とは逆に、特定の薬剤に対する感受性を付与するような遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して、該薬剤に対する感受性を付与することもできる。かかる場合、生体に移植した後のリンパ球を当該薬剤の投与によって除去することが可能となる。薬剤に対する感受性を付与する遺伝子としては、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子が例示される。

実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。

製造例1 フィブロネクチンフラグメントの調製

(1) フィブロネクチンフラグメントの調製

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-271は、*Escherichia coli* HB101/pHD101 (FERM BP-2264) より、米国特許第5,198,423号明細書に記載の方法により調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-296、CH-271、CH-296はそれぞれ、*Escherichia coli* HB101/pHD102 (FERM BP-7420)、*Escherichia coli* HB101/pCH101 (FERM BP-2799)、*Escherichia coli* HB101/pCH102 (FERM BP-2800) を用い、これを上記の明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-274は、*Escherichia coli* JM109/pTF7221 (FERM BP-1915) を用い、これを米国特許第5,102,988号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-CS1は、*Escherichia coli* HB101/pCS25 (FERM BP-5723) を用い、日本特許3104178号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-89、CHV-179は、それぞれ*Escherichia coli* HB101/pCHV89 (FERM P-12182)、*Escherichia coli* HB101/pCHV179 (FERM P-12183) を用い、日本特許2729712号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-90は日本特許27

29712号明細書に記載の方法で調製した。すなわち、当該明細書に記載の操作によってプラスミド pCHV90 を構築したうえ、該プラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物より CHV-90 を調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-181 は、国際公開第97/18318号パンフレットに記載の方法で、CHV-181 をコードする DNA を含有するプラスミド (pCHV181) を構築した後、該プラスミドを導入された大腸菌 (*Escherichia coli* HB101/pCHV181) を培養し、該培養物より、上記の CHV-179 と同様の方法で調製した。

(2) CHV-92 の調製

上記のポリペプチド CHV-181 を発現させるためのプラスミド pCHV181 について、CHV-181 をコードする領域中の III-13 領域をコードする領域を欠失したプラスミド CHV92 を構築した。欠失操作は日本特許2729712号明細書に記載の、プラスミド pCHV179 からの III-14 コード領域の欠失操作に準じて行った。

上記のプラスミド pCHV92 で形質転換された大腸菌 HB101 (*Escherichia coli* HB101/pCHV92) を培養し、該培養物より日本特許第2729712号明細書に記載の CHV-89 ポリペプチドの精製方法に準じて精製操作を行い、精製 CHV-92 標品を得た。

(3) H-275-Cys の調製

ポリペプチド H-275-Cys を発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。*Escherichia coli* HB101/pCH102 (FERM BP-2800) よりプラスミド pCH102 を調製した。このプラスミドを鋳型とし、配列表の配列番号20に塩基配列を示すプライマー12Sと配列表の配列番号21に塩基配列を示すプライマー14Aとを用いた PCR を行い、フィブロネクチンのヘパリン

結合ドメインをコードする約0.8kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片をNcoI、BamHI（ともにタカラバイオ社製）で消化した後、NcoI、BamHIで消化したpTV118N（タカラバイオ社製）とライゲーションすることにより、プラスミドpRH1を構築した。

プラスミドベクターpINIII-ompA₁〔グーライエブ J. ら (Ghrayeb J., et al.)、EMBO J.、第3巻、第10号、第2437～2442頁（1984）〕をBamHIとHincII（タカラバイオ社製）とで消化し、リポプロテインターミネーター領域を含む約0.9kbのDNA断片を回収した。これをBamHIとHincIIで消化した上記のプラスミドpRH1と混合してライゲーションを行い、lacプロモーター、ヘパリン結合ドメインをコードするDNA断片およびリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミドpRH1-Tを得た。

このプラスミドpRH1-Tを鋳型とし、配列表の配列番号22に塩基配列を示すプライマーCys-Aと配列表の配列番号23に塩基配列を示すプライマーCys-Sとを用いたPCR反応の後、回収した増幅DNA断片をNotI（タカラバイオ社製）で消化し、さらに該DNA断片をセルフライゲーションさせた。こうして得られた環状DNAをSpeIとScaI（タカラバイオ社製）とで消化して得られる2.3kbのDNA断片と、プラスミドpRH1-TをSpeIとScaI（タカラバイオ社製）とで消化して得られる2.5kbのDNA断片とを混合してライゲーションを行い、プラスミドpRH-Cysを得た。該プラスミドには、前記のH-271のN末端側にMet-Ala-Ala-Serの4アミノ酸が付加され、さらにC末端にCysが付加されたポリペプチドH-275-Cysがコードされている。

ポリペプチドH-275-Cysは以下の方法により調製した。上記のプラスミドpRH-Cysで形質転換された大腸菌HB101（Escherichia coli HB101/pRH-Cys）を120mlのLB培地中、37℃で1晩培養した。培養液より回収した菌体を40mlの破碎用緩衝液（50mM Tris-HCl、1mM

EDTA、150mM NaCl、1mM DTT、1mM PMSF、pH 7.5) に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した。遠心分離を行って得られた上清を精製用緩衝液(50mM Tris-HCl、pH 7.5) で平衡化されたハイトラップヘパリンカラム(ファルマシア社製)にかけた。同緩衝液でカラム内の非吸着画分を洗浄した後、0~1M NaCl 濃度勾配を持つ精製用緩衝液で溶出を行った。溶出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、H-275-Cys の分子量に相当する画分を集めて精製H-275-Cys 標品を得た。

実施例1 CTLにおけるCD8陽性細胞比率

(1) PBMCの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたHLA-A2.1保有ヒト健常人ドナーより成分採血を実施後、採血液をPBS(-)で2倍希釈し、Ficoll-paque(ファルマシア社製)上に重層して500×gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血単核細胞(PBMC)をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは90% FBS(Bio Whittaker社製)/10%DMSO(SIGMA社製)からなる保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。CTL誘導時にはこれら保存PBMCを37℃水浴中にて急速融解し、10μg/ml DNase(Calbiochem社製)を含むRPMI1640培地(Bio Whittaker社製)で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

(2) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導は、Bednarekらの方法[J. Immunology、第147巻、第12号、第4047~4053頁(1991)]を一部改変して実施した。すなわち、5%ヒトAB型血清、0.1mM非必須アミノ酸、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン(全てBio Whittaker社製)、10mM HEPES(ナカライテスク社製)、1%ストレプトマイシン-ペニシリン(ギブコBRL社製)を含むRPM

I1640培地 (Bio Whittaker社製) (以下5HRPMIと略す) に $1\sim4\times10^6$ cells/mlとなるように実施例 2 - (1) で調製したPBMCを懸濁後、24穴細胞培養プレート (Falcon社製) に1ml/ウェルずつまき、5% CO₂ 湿式インキュベーター中、37℃で1.5時間インキュベートし、プラスチック接着性の単球を分離した。その後、非接着性の細胞をRPMI1640培地を用いて回収し、レスポンド細胞として氷上に保存した。分離した単球には、抗原ペプチドとして5μg/mlのインフルエンザウイルスタンパク質由来エピトープペプチド (配列表の配列番号 24 に記載のマトリックスプロテイン由来A2.1結合性ペプチド) および1μg/mlのβ2マイクログロブリン (スクリプス社製) を含む5HRPMIを0.5mlずつ添加し、2時間室温にてインキュベート後、X線照射 (5500R) して抗原提示細胞とした。各ウェルからペプチド液を吸引除去し、ウェルをRPMI1640培地を用いて洗浄後、氷上保存しておいたレスポンド細胞を $0.5\sim2\times10^6$ cells/mlとなるよう5HRPMIに懸濁し、1ml/ウェルずつ抗原提示細胞上に添加した。このとき、製造例 1 に記載の各フィブロネクチンフラグメント (以下、FNfrと記載する) を終濃度10μg/mlとなるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。プレートを5% CO₂ 中、37℃で培養した。培養開始後2日目に、60U/mlのIL-2 (塩野義製薬社製) と10μg/mlのFNfrを含む1mlの5HRPMI (対照は、IL-2のみ含有) を各ウェルに添加、また5日目には培養上清を半分除去後同様のIL-2およびFNfr含有培地 (対照はIL-2のみ含有) を1mlずつ添加した。7日目に上記と同様にして抗原提示細胞を調製したあと、1週間培養したレスポンド細胞を $0.5\sim2\times10^6$ cells/mlとなるように5HRPMIに懸濁し、調製した抗原提示細胞上に1ml/ウェルずつ添加し、再刺激した。このとき、FNfrを終濃度10μg/mlとなるように添加した (対照は無添加)。再刺激後2日目に、60U/mlのIL-2および10μg/mlのFNfrを含む (対照はIL-2のみ含有) 1mlの5HRPMIを各ウェルに添加した。また5日目には培養上清を半分除去後、除去前と同じ内容の培地を1mlずつ添加し、さらに培養を2日続け、CTLを誘導した。

(3) CTL細胞傷害活性の測定

実施例1-(2)で調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、Calcein-AMを用いた細胞傷害活性測定法〔リヒテンフェルズ R. ら (Lichtenfels R., et al.)、J. Immunol. Methods、第172巻、第2号、第227～239頁(1994)〕にて評価した。一晚エピトープペプチドと共培養、もしくはエピトープペプチド非存在下で培養したHLA-A2.1保持EBVトランスフォームB細胞(細胞名 221A2.1)を 1×10^6 cells/mlとなるよう5%FBS (Bio Whittaker社製)を含むRPMI1640培地に懸濁後、終濃度 $25 \mu\text{M}$ となるようにCalcein-AM (ドータイト社製)を添加し、 37°C で1時間培養した。細胞をCalcein-AMを含まない培地にて洗浄後20倍量のK562細胞(ATCC CCL-243)と混合し、Calcein標識標的細胞とした。なお、K562細胞はレスポnder細胞中に混入するNK細胞による非特異的傷害活性を排除するために用いた。

実施例1-(2)で調製したメモリーCTLをエフェクター細胞として $1 \times 10^5 \sim 9 \times 10^6$ cells/mlとなるように5HRPMIで段階希釈後、96穴細胞培養プレートの各ウェルに $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注しておき、これらに 1×10^5 cells/mlに調製したCalcein標識標的細胞を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ添加した。上記細胞懸濁液の入ったプレートを $400 \times g$ で1分間遠心後、 37°C の湿式 CO_2 インキュベーター内で4時間インキュベートした。4時間後、各ウェルから培養上清 $100 \mu\text{l}$ を採取し、蛍光プレートリーダー($485\text{nm}/538\text{nm}$)によって培養上清中に放出されたcalcein量(蛍光強度)を測定した。CTLの細胞傷害活性は以下の式1にしたがって算出した。

式1：細胞傷害活性(%) =

$$[(\text{各ウェルの測定値} - \text{最小放出量}) / (\text{最大放出量} - \text{最小放出量})] \times 100$$

上式において最小放出量は標的細胞およびK562細胞のみ含有するウェルのcalcein放出量であり、標的細胞からのcalcein自然放出量を示す。また、最大放出量は標的細胞に界面活性剤であるTriton X-100（ナカライテスク社製）を0.1%加えて細胞を完全破壊した際のcalcein放出量を示している。この結果、誘導直後において、細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

（４）CTL細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率の測定

実施例1-（２）で調製した 2×10^5 cellsのCTLを1%パラホルムアルデヒド（ナカライテスク社製）を含むPBS（ニッスイ社製）を用いて固定した後、PBSで洗浄した。固定細胞を1%BSA（SIGMA社製）を含む100 μ lのPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体（ともにDAKO社製）を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、再度1%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁した。この細胞をFACS Vantage（ベクトン・ディッキンソン社製）を用いたフローサイトメトリーに供し、CD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表1に示す。

表 1

フィブロネクチンフラグメント	CD 8 陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr無添加)	60.2
CH-296	88.8
CH-271	65.7
H-271	81.4
C-274	86.2
H-275-Cys	79.0
CHV-89	70.2
CHV-90	77.0
CHV-181	73.1
対照 (FNfr無添加)	33.0
H-296	40.1
C-CS1	41.6
CHV-92	44.0
CHV-179	37.8

表 1 に示されるように、CTL 誘導時に各種のフィブロネクチンフラグメントを添加した群においては、これらを添加しない対照に比較して、CTL 誘導開始後 14 日目における CD 8 陽性細胞の比率が高い。すなわち、フィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、CD 8 陽性細胞を有意に増殖させながら CTL を誘導することが可能であることが明らかとなった。

実施例 2 インターロイキン-2 レセプター発現の誘導

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例1-(2)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例1-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) CTLにおけるインターロイキン-2レセプター発現率の測定

実施例2-(1)で調製した誘導開始後14日目のCTLにおけるインターロイキン-2レセプター(IL-2R)発現率の測定は、実施例1-(4)に記載の方法に準じて行った。なお、今回の操作ではFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体をFITC標識マウス抗ヒトIL-2R(CD25)抗体(DAKO社製)に変更した。結果を表2に示す。

表 2

フィブロネクチンフラグメント	I L - 2 R 発現陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr無添加)	29.8
CH-296	65.9
H-296	59.4
H-271	54.6
C-274	61.5
H-275-Cys	78.2
CHV-89	82.3
CHV-90	48.3
CHV-92	55.6
CHV-179	50.3
CHV-181	44.8
対照 (FNfr無添加)	46.9
CH-271	60.9
C-CS1	72.3

表 2 に示されるように、各種のフィブロネクチンフラグメントを添加して誘導されたCTLにおいてはいずれも細胞集団中のIL-2R発現率の上昇が見られた。すなわち、フィブロネクチンフラグメントの共存下に誘導を行うことにより、IL-2R発現量を増加させながらCTLを誘導することが可能であることが明らかとなった。

実施例 3 CTLの拡大培養

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例1-(2)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例1-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) CTLの拡大培養

実施例3-(1)で調製したCTLを5HRPMIで洗浄後、 3×10^4 cells/mlに調製した。一方、実施例1-(1)と同様の方法により採取したHLA-A2.1非保持 allogenic PBMCをX線照射(3300R)し、培地で洗浄後 $2 \sim 5 \times 10^6$ cells/mlに調製した。これらのCTL(3×10^4 cells)とallogenic PBMC($4 \sim 10 \times 10^6$ cells)を10mlの5HRPMIもしくは10%HycloneFBS、0.1mM非必須アミノ酸、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン(全てBio Whittaker社製)、10mM HEPES(ナカライテスク社製)、1%ストレプトマイシン-ペニシリン(ギブコBRL社製)を含むRPMI1640培地(Bio Whittaker社製)(以下、10HycloneRPMIと略す)に懸濁し、さらに終濃度50ng/mlの抗CD3抗体(ヤンセン協和社製)を加えて12.5cm²のフラスコ(ファルコン社製)に入れ、37℃ 湿式CO₂インキュベーター中で14日間培養した。この際、CTL誘導の際に添加したものと同一終濃度10μg/mlのFNfrを添加した。また、FNfrを添加せずに誘導を行った対照群にはFNfrは添加しなかった。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、60U/mlのIL-2を含む5HRPMIもしくは10HycloneRPMI 5mlを各フラスコに添加した。この際、FNfr添加群の培地には同濃度のFNfrを添加した。拡大培養開始後、14日目に実施例1-(3)と同様の方法にてCTLの細胞傷害活性を測定し、拡大培養前の細胞傷害活性をどれだけ維持してい

るかを「細胞傷害活性維持（％）」として算出した。

「細胞傷害活性維持（％）」は以下の式 2 にしたがって算出した。

式 2：細胞傷害活性維持（％）＝

〔拡大培養後の細胞傷害活性（％）／拡大培養前の細胞傷害活性（％）〕×100

測定結果を表 3 に示す。なお、表中において E/T ratio は標的細胞に対するエフェクター細胞の比を示す。

表 3

培地	フィブロネクチンフラグメント	細胞傷害活性維持 (%)
		E/T ratio=3
5HRPMI	対照 (FNfr無添加)	17.3
	CH-271	53.5
	H-296	49.3
	C-CS1	49.3
	CHV-92	66.2
10HycloneRPMI	対照 (FNfr無添加)	48.1
	CH-271	250.8
	H-296	162.3
	H-271	72.2
	C-CS1	100.2
	CHV-92	157.8
培地	フィブロネクチンフラグメント	細胞傷害活性維持 (%)
		E/T ratio=10
10HycloneRPMI	対照 (FNfr無添加)	46.3
	CHV-89	69.0
	CHV-90	75.6
培地	フィブロネクチンフラグメント	細胞傷害活性維持 (%)
		E/T ratio=3
10HycloneRPMI	対照 (FNfr無添加)	70.4
	CH-296	113.5
10HycloneRPMI	対照 (FNfr無添加)	79.3
	CHV-179	190.0
	CHV-181	94.5

表3に示されるように、誘導時ならびに拡大培養時に各種のフィブロネクチンフラグメントを添加した群のCTLは、フィブロネクチンフラグメントを添加しなかった対照に比べて、14日間の拡大培養の後も特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、フィブロネクチンフラグメントの共存下に誘導、拡大培養を行うことにより、高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態でのCTLの拡大培養が可能であることが明らかになった。

実施例4 CTL拡大培養後細胞集団におけるIL-2Rの発現

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例1-(2)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例1-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) 拡大培養されたCTLにおけるインターロイキン-2レセプター発現率の測定

実施例4-(1)で調製したCTLを実施例3-(2)と同様の方法で拡大培養した。こうして得られた、拡大培養後のCTLについて、実施例2-(2)に記載の方法でIL-2R発現陽性細胞の比率を測定した。結果を表4に示す。

表 4

フィブロネクチンフラグメント	I L - 2 R 発現陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr無添加)	19.5
CH-271	45.3
H-296	47.7
H-271	48.3
C-274	53.5
C-CS	39.7
CHV-891	28.6
CHV-90	60.0
CHV-179	53.7
CHV-181	50.3
対照 (FNfr無添加)	26.8
CH-296	36.1
対照 (FNfr無添加)	18.4
H-275-Cys	56.5
CHV-92	59.9

表 4 に示されるように、CTL 誘導時および拡大培養時に各種のフィブロネクチンフラグメントを添加した群においては、いずれも拡大培養後の細胞集団上における I L - 2 R 発現細胞の比率の上昇が認められた。

つまり、フィブロネクチンフラグメントの存在下に CTL を誘導し、拡大培養することにより、I L - 2 R の発現量を増加させながら、CTL を拡大培養することが可能であることが明らかになった。

実施例 5 フィブロネクチン存在下でのCTL誘導、拡大培養

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1 - (1) に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例 1 - (2) と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。このとき、FNfrにかえてフィブロネクチン（カルビオケム社製）を終濃度10 μ g/mlとなるように添加した（対照は無添加）。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例 1 - (3) に記載の方法で評価したところ、誘導時のフィブロネクチン添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) CTLにおけるインターロイキン-2レセプター発現率の測定

実施例 5 - (1) で調製したCTLについて、実施例 2 - (2) に記載の方法でIL-2R発現陽性細胞の比率を測定した。結果を表5に示す。

表 5

フィブロネクチン	IL-2R発現陽性細胞含有率 (%)
対照（フィブロネクチン無添加）	34.0
フィブロネクチン	64.6

表5に示されるように、フィブロネクチン存在下に誘導されたCTLでは、細胞集団上におけるIL-2Rの発現量の上昇が見られた。

つまり、フィブロネクチン存在下にCTLの誘導を行うことにより、IL-2Rの発現量を増加させながらCTLを誘導することが可能であることが明らかになった。

(3) CTLの拡大培養

実施例 5 - (1) で調製したCTLを実施例 3 - (2) と同様の方法で拡大培

養した。このとき、誘導時にフィブロネクチンが添加されていたものにはフィブロネクチン（カルビオケム社製）を終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加した（対照は無添加）。得られたCTLの細胞傷害活性を実施例1－（3）と同様の方法にて測定し、拡大培養前の細胞傷害活性をどれだけ維持しているかを「細胞傷害活性維持（％）」として算出した。

測定結果を表6に示す。

表6

フィブロネクチン	細胞傷害活性維持（％）	E/T ratio=3
対照（フィブロネクチン無添加）	48.1	
フィブロネクチン	148.9	

表6に示されるように、フィブロネクチンの存在下にCTL誘導および拡大培養を行った群においては高い細胞傷害活性が保持されていた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもフィブロネクチンを添加しなかった対照の細胞傷害活性は明らかに低下していた。つまり、フィブロネクチンをCTL誘導時および拡大培養時に添加することにより、特異的で細胞傷害活性を長期的に保持した状態でのCTLの拡大培養が可能であることが明らかになった。

実施例6 固定化されたフィブロネクチン(FN)フラグメント存在下でのCTL拡大培養

(1) FNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養用器材（容器）にフィブロネクチンフラグメントを固定化した。すなわち、24穴細胞培養プレート、 12.5cm^2 フラスコに各種フィブロネクチンフラグメント（終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ ）を含むPBSを $1\sim 2\text{ml}$ ずつ添加し、室温で5時間インキュベートした後、使用時まで 4°C で保存した。また上記のプレート、フラスコは使用前にPBSで2回洗浄した。

(2) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例1-(2)の方法に準じて、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。このとき、培養器材としてFNfrを固定化したプレートを使用した（対照には固定化処理を行っていないプレートを使用）。誘導後のCTLの細胞傷害活性を、実施例1-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時に使用したプレートのFNfr固定化の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(3) CTLの拡大培養

実施例6-(2)で調製したCTLを実施例3-(2)の方法に準じて拡大培養した。この際、培養器材として各種FNfrを固定化したフラスコを使用した（対照には固定化処理を行っていないフラスコを使用）。また、培地には10HycloneR PMIを用いた。

こうして拡大培養されたCTLの細胞傷害活性が拡大培養前に比較してどれだけ維持されているかを「細胞傷害活性維持(%)」として表し評価した。

測定結果を表7に示す。

表7

フィブロネクチンフラグメント	細胞傷害活性維持 (%)
	E/T ratio=3
対照 (FNfr非固定化)	48.1
CH-271	95.4
H-296	95.0
H-271	133.9
C-CS1	73.8
H-275-Cys	137.7
CHV-92	92.7
対照 (FNfr非固定化)	18.7
CH296	67.4
C-CS1	78.5
CHV-89	90.8
CHV-90	73.0
CHV-179	112.5
CHV-181	25.6

表7に示されるように、CTL誘導時および拡大培養時にフィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材（プレート、フラスコ）を使用した群のCTLは拡大培養後にも特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもフィブロネクチンフラグメントを固定化しない器材を使用した対照では、細胞傷害活性は明らかに低下していた。つまり、固定化されたフィブロネクチンフラグメントを使用することにより、培地中に溶解しているフラグメントと同様に高い細胞傷害活性を長期的に保持したCTLを拡大

培養することが可能であることが明らかになった。

実施例 7 CTL 拡大培養後細胞集団における CD 8 陽性細胞含有比率

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリー CTL の誘導

実施例 1 - (1) に記載の方法で分離、保存した PBMC を用い、実施例 1 - (2) と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリー CTL の誘導を行った。誘導開始後 14 日目の CTL の細胞傷害活性を、実施例 1 - (3) に記載の方法で評価したところ、誘導時の FNfr 添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) 拡大培養された CTL における CD 8 陽性細胞含有比率の測定

実施例 7 - (1) で調製した CTL を実施例 3 - (2) と同様の方法で拡大培養した。こうして得られた、拡大培養後の CTL について、実施例 1 - (4) に記載の方法で CD 8 陽性細胞含有比率を測定した。結果を表 8 に示す。

表 8

フィブロネクチンフラグメント	CD 8 陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr無添加)	40.9
CH-296	85.1
CH-271	72.1
H-271	83.9
対照 (FNfr無添加)	75.4
H-296	87.2
C-CS1	86.5
対照 (FNfr無添加)	33.4
CHV-90	72.9
CHV-92	51.6
CHV-179	57
CHV-181	63.5

表 8 に示されるように、CTL 誘導時および拡大培養時に各種のフィブロネクチンフラグメントを添加した群においては、いずれも拡大培養後の細胞集団中における CD 8 陽性細胞含有比率の上昇が認められた。

つまり、フィブロネクチンフラグメントの存在下に CTL を誘導し、拡大培養することにより、CD 8 陽性細胞を有意に増殖させながら、CTL を拡大培養することが可能であることが明らかになった。

実施例 8 固定化されたフィブロネクチンフラグメント存在下で誘導された CTL におけるインターロイキン-2 レセプター発現の誘導

(1) FNフラグメント固定化

実施例6-(1)と同様の方法で、培養器材(容器)にフィブロネクチンフラグメントを固定化した。

(2) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例1-(2)の方法に準じて、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。このとき、培養器材として実施例8-(1)で作成したFNfr固定化プレートを使用した(対照には固定化処理を行っていないプレートを使用)。誘導後のCTLの細胞傷害活性を、実施例1-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時に使用したプレートのFNfr固定化の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(3) CTLの拡大培養

実施例8-(2)で調製したCTLを実施例3-(2)の方法に準じて拡大培養した。この際、培養器材として実施例8-(1)で作成したFNfr固定化フラスコを使用した(対照には固定化処理を行っていないフラスコを使用)。また、培地には10HycloneRPMIを用いた。

こうして得られた拡大培養前後のCTLについて、実施例2-(2)に記載の方法でIL-2R発現陽性細胞比率を測定した。

測定結果を表9に示す。

表 9

フィブロネクチン フラグメント	拡大培養前 IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%)	拡大培養後 IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr非固定化)	14.4	6.8
CH-296	68.1	34.0
CH-271	28.3	14.7
H-296	21.3	22.9
C-274	30.3	20.5
C-CS1	56.8	34.1
H-275-Cys	43.6	17.2
CHV-89	34.6	36.8
CHV-90	47.3	29.1
CHV-92	37.2	13.0
CHV-179	52.3	16.3
CHV-181	37.4	18.3

表 9 に示されるように、CTL 誘導時および拡大培養時にフィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材（プレート、フラスコ）を使用した群の CTL は拡大培養前後のどちらにおいても対照群と比較して IL-2R 発現率の上昇がみられた。つまり、固定化されたフィブロネクチンフラグメントを使用することにより、培地中に溶解しているフラグメントと同様に IL-2R 発現量を高く維持しながら CTL を拡大培養することが可能であることが明らかになった。

実施例 9 CD8 細胞表面上のインターロイキン-2 レセプター発現の誘導

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリー CTL の誘導

実施例 1 - (1) に記載の方法で分離、保存した PBMC を用い、実施例 1 - (2) と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリー CTL の誘導を行った。誘導開始後 14 日目の CTL の細胞傷害活性を、実施例 1 - (3) に記載の方法で評価したところ、誘導時の FNfr 添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) CTL におけるインターロイキン-2 レセプター発現率の測定

実施例 9 - (1) で調製した誘導開始後 14 日目の CTL (特に CD8 細胞表面上) におけるインターロイキン-2 レセプター (IL-2R) 発現率の測定は、実施例 1 - (4) に記載の方法に準じて行った。なお、今回の操作では 1 次抗体として FITC 標識マウス抗ヒト CD8 抗体を、2 次抗体として PE 標識マウス抗ヒト IL-2R (CD25) 抗体 (DAKO 社製) を使用した。結果を表 10 に示す。

表 10

フィブロネクチンフラグメント	CD8/IL-2R 二重陽性細胞集団含有率 (%)
対照 (FNfr 無添加)	30.7
CH-296	56.8

表 10 に示されるように、各種のフィブロネクチンフラグメントを添加して誘導された CTL においては CD8 陽性細胞集団における IL-2R 発現率の上昇が見られた。すなわち、フィブロネクチンフラグメントの共存下に誘導を行うことにより、CD8 細胞表面上の IL-2R 発現量を増加させながら CTL を誘導することが可能であることが明らかとなった。

実施例 10 CTL 拡大培養前後細胞集団における CD8 陽性細胞含有比率
(フィブロネクチンとフィブロネクチンフラグメントとの比較)

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例1-(2)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例1-(3)に記載の方法で評価したところ、誘導時のフィブロネクチンおよびFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) 拡大培養されたCTLにおけるCD8陽性細胞含有比率の測定

実施例10-(1)で調製したCTLを実施例3-(2)と同様の方法で拡大培養した。こうして得られた、拡大培養前後のCTLについて、実施例1-(4)に記載の方法でCD8陽性細胞含有比率を測定した。結果を表11に示す。

表11

	拡大培養前	拡大培養後
	CD8陽性細胞含有率 (%)	CD8陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr無添加)	50.5	31.2
フィブロネクチン	67.3	22.5
H-271	75.1	51.3
CHV-90	71.3	43.5

表11に示されるように、CTL誘導時および拡大培養時にフィブロネクチンフラグメントを添加した群においては、いずれも対照群に対して拡大培養前および拡大培養後の細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率の上昇が認められた。

つまり、フィブロネクチンそのものに比べ、フィブロネクチンフラグメントの存在下にCTL誘導し、拡大培養を行う方が、CD8陽性細胞を拡大培養前およ

び拡大培養後いずれにおいても有意に増殖させながら、CTLを拡大培養するのに好適であることが明らかになった。

実施例 1 1 CTL 拡大培養前後細胞集団における IL-2R 発現の誘導

(フィブロネクチンとフィブロネクチンフラグメントとの比較)

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリー CTL の誘導

実施例 1 - (1) に記載の方法で分離、保存した PBMC を用い、実施例 1 - (2) と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリー CTL の誘導を行った。誘導開始後 14 日目の CTL の細胞傷害活性を、実施例 1 - (3) に記載の方法で評価したところ、誘導時のフィブロネクチンおよび FNfr 添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

(2) 拡大培養された CTL における IL-2R 発現陽性細胞含有比率の測定

実施例 1 1 - (1) で調製した CTL を実施例 3 - (2) と同様の方法で拡大培養した。こうして得られた、拡大培養前後の CTL について、実施例 2 - (2) に記載の方法で IL-2R 発現陽性細胞含有比率を測定した。結果を表 1 2 に示す。

表 1 2

	拡大培養前	拡大培養後
	IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%)	IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr 無添加)	34.0	15.3
フィブロネクチン	64.6	50.6
H-271	76.6	76.8

表 1 2 に示されるように、C T L 誘導時および拡大培養時にフィブロネクチンフラグメントを添加した群においては、いずれも対照群に対して拡大培養前および拡大培養後の細胞集団中におけるIL-2R発現陽性細胞含有比率の上昇が認められた。この上昇率はフィブロネクチン添加した群と比較して有意に高いものであった。

つまり、フィブロネクチンそのものに比べ、フィブロネクチンフラグメントの存在下にC T L を誘導し、拡大培養を行う方が、IL-2R発現陽性細胞を拡大培養前および拡大培養後いずれにおいても有意に増殖させながら、C T L を拡大培養するのに好適であることが明らかになった。

実施例 1 2 C T L の拡大培養（フィブロネクチンとフィブロネクチンフラグメントとの比較）

（1）抗インフルエンザウイルス メモリーC T L の誘導

実施例 1 - （1）に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例 1 - （2）と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーC T L の誘導を行った。誘導開始後 1 4 日目のC T L の細胞傷害活性を、実施例 1 - （3）に記載の方法で評価したところ、誘導時のフィブロネクチンおよびFNfr添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんどなかった。

（2）C T L の拡大培養

実施例 1 2 - （1）で調製したC T L を実施例 3 - （2）と同様の方法で拡大培養した。また、培地には10HycloneRPMIを用いた。

こうして拡大培養されたC T L の細胞傷害活性が拡大培養前に比較してどれだけ維持されているかを「細胞傷害活性維持（％）」として表し評価した。

測定結果を表 1 3 に示す。

表 1 3

	細胞傷害活性維持 (%)
	E/T r a t i o = 3
対照 (FNfr無添加)	48.1
フィブロネクチン	148.9
CH-271	250.8

表 1 3 に示されるように、誘導時ならびに拡大培養時にフィブロネクチンフラグメントを添加した群のCTLは、フィブロネクチンフラグメントを添加しなかった対照群に比べて、14日間の拡大培養後も特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。またその活性はフィブロネクチンを添加した群と比較して有意に高いものであった。

つまり、フィブロネクチンそのものに比べ、フィブロネクチンフラグメントの共存下に誘導、拡大培養を行うのが、高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態でのCTLの拡大培養に好適であることが明らかになった。

実施例 1 3 LAK細胞 (Lymphokine-activated killer cells) 培養系における拡大培養率の測定

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNもしくはFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材 (容器) に抗ヒトCD3抗体およびフィブロネクチンまたはFNフラグメントを固定化した。すなわち24穴細胞培養プレートまたは12.5cm²細胞培養フラスコ (Falcon社製) に抗ヒトCD3抗体 (ヤンセン協和社製) (終濃度5μg/ml) を含むPBSを1ml (24穴プレートの場合) または2ml (12.5cm²フラスコの場合) ずつ添加した。この時、フィブロネクチンまたはFNフラグメ

ント添加群にはフィブロネクチンまたは製造例 1 に記載の各フィブロネクチンフラグメント (FNfr) を終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ (24穴プレートの場合) または $25\mu\text{g/ml}$ (12.5cm^2 フラスコの場合) となるように添加した。対照として、フィブロネクチンおよびFNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで 4°C で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、5%ヒトA B型血清 (Bio whittaker社製)、1%ストレプトマイシン・ペニシリン (ギブコBRL社製) を含むXVIVO20培地 (Bio whittaker社製) (以下5HXVIVO20と略す) で1回洗浄し各実験に供した。

(2) LAK細胞の誘導および培養

5HXVIVO20に $0.5\sim 1\times 10^6\text{ cells/ml}$ となるように実施例 1 - (1) で調製したPBMCを懸濁後、実施例 1 3 - (1) で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびフィブロネクチンもしくはFNfr固定化プレートに 1ml/ウェル ずつまき、終濃度 1000U/ml となるようにIL-2 (塩野義製薬社製) を添加した。これらのプレートを5% CO_2 中 37°C で培養した (培養0日目)。培養開始後2日目、3日目には 1000U/ml のIL-2を含む5HXVIVO20を 1ml/ウェル ずつ添加した。培養開始後4日目には適宜5HXVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度 500U/ml となるようIL-2を添加した。培養を継続し、2~3日毎に培養開始5日目と同様に適宜5HXVIVO20を用いて希釈し終濃度 $300\sim 500\text{U/ml}$ となるようIL-2を添加した。培養開始後7~15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表 1 4 に示す。

表 1 4

培養日数	FN/FNフラグメント	拡大培養率（倍率）
7日間	対照（FN/FNfr非固定化）	x 1 0 3
	フィブロネクチン	x 2 3 3
	CH-296	x 2 1 8
	H-296	x 2 4 7
9日間	対照（FN/FNfr非固定化）	x 2 5 0
	フィブロネクチン	x 1 1 9 0
	CH-296	x 1 2 8 6
	H-296	x 1 0 7 5
11日間	対照（FN/FNfr非固定化）	x 5 7 6
	フィブロネクチン	x 2 3 0 4
	CH-296	x 1 7 2 8
	H-296	x 2 0 8 8
15日間	対照（FN/FNfr非固定化）	x 6 6 0
	C-CS1	x 1 1 7 0
	対照（FN/FNfr非固定化）	x 1 9 8 0
	フィブロネクチン	x 3 3 4 8
	CH-296	x 5 3 6 4
	対照（FN/FNfr非固定化）	x 2 9 0 6
	C-CS1	x 5 1 1 7

表 1 4 に示されるように、LAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。また、各フィブロネクチンフラグメント固定化群の拡大培養

率は培養開始後15日目にはフィブロネクチンを固定化した培養器材を使用した群よりも高いものであった。よって、拡大培養が長期に渡る場合、フィブロネクチンそのものに比べ、LAK細胞誘導初期にフィブロネクチンフラグメントを共存させることが、より高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養するのに好適であることが明らかとなった。

実施例 1 4 LAK細胞培養系における増殖率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例 1 3 - (2) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際の培養開始後4日目から7日目までの細胞の増殖率を算出した。結果を表 1 5 に示す。

表 1 5

培養開始時細胞数	フィブロネクチンフラグメント	4日目から7日目までの増殖率 (倍率)
5x10 ⁶ cells/ml	対照 (FNfr非固定化)	2.7倍
	CH-296	16.9倍
	対照 (FNfr非固定化)	33.5倍
	H-296	49.5倍
1x10 ⁶ cells/ml	対照 (FNfr非固定化)	6.2倍
	CH-296	20.4倍
	対照 (FNfr非固定化)	23.5倍
	H-296	43.5倍

表 1 5 に示されるように、LAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して培養開始4日目から7日目までのLAK細胞の増殖率が高い。すなわちLAK細胞誘導初期にフィ

プロネクチンフラグメントを共存させることにより、早い増殖速度でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 15 LAK細胞培養系における拡大培養率の測定（低細胞数からのLAK細胞誘導・培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例 13 - （2）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際、培養開始時の細胞濃度を $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml ($1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/cm²) となるようにした。培養開始後15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率を算出した。結果を表 16 に示す。

表 16

培養開始細胞数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率（倍率）
2×10^5 cells/ml (1×10^5 cells/cm ²)	対照（FNfr非固定化）	x 48.6
	CH-296	x 1004
5×10^5 cells/ml (2.5×10^5 cells/cm ²)	対照（FNfr非固定化）	x 438
	CH-296	x 1094
1×10^6 cells/ml (5×10^5 cells/cm ²)	対照（FNfr非固定化）	x 1020
	CH-296	x 1476

表 16 に示されるように、LAK細胞誘導時に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養開始時の細胞数に関わらず、培養開始後15日目に高い拡大培養率が得られた。これに対して対照群では、培

養開始時の細胞数が低い場合、培養開始後15日目の拡大培養率が低かった。すなわち低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、培養開始時の細胞数に関わらず、高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 1 6 LAK細胞培養系における拡大培養率の測定（低細胞数からのLAK細胞誘導・培養／希釈操作なしでの培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

5HXVIVO20に 1×10^4 cells/mlとなるように実施例 1 - （1）で調製したPBMCを懸濁後、実施例 1 3 - （1）と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびフィブロネクチンもしくはFNfr固定化6ウェルプレートに1ml/ウェルずつまき、5HXVIVO20 4mlを加え（ 1×10^3 cells/cm²）、さらに終濃度500U/mlとなるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目、4日目には終濃度500U/mlとなるようにIL-2を添加した。培養を継続し、培養開始後7日目以降2～3日毎に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。この間培養液の希釈操作は全く行わなかった。

培養開始後15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率を算出した。結果を表 1 7 に示す。

表 1 7

培養日数	FN/FNフラグメント	拡大培養率（倍率）
15日間	対照（FN/FNfr非固定化）	x 15
	フィブロネクチン	x 628
	CH-296	x 773
	H-296	x 960

表 1 7 に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養開始後15日目に高い拡大培養率が得られた。また、この拡大培養率はフィブロネクチンを固定化した培養器材を使用した群と比較しても高いものであった。これに対して対照群では培養開始15日目でもほとんど増殖しなかった。すなわち低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンもしくはフィブロネクチンフラグメント、好ましくはフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 1 7 LAK細胞におけるIL-2R発現の誘導

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例 1 3 - （2）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

（2）LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例 1 7 - （1）で誘導・培養したLAK細胞におけるIL-2R発現率の測定は実施例 2 - （2）に記載の方法に準じて行った。結果を表 1 8 に示す。かかる表で

は I L - 2 R 発現陽性細胞含有率 (%) を IL-2R 発現率 (%) と表示する。

表 1 8

培養日数	FN/FNフラグメント	IL-2R発現率 (%)
4日間	対照 (FN/FNfr非固定化)	86.5
	フィブロネクチン	97.2
	CH-296	97.6
	H-296	97.7
	C-CS1	94.9
7日間	対照 (FN/FNfr非固定化)	59.3
	フィブロネクチン	77.6
	CH-296	90.4
	H-296	89.1
	C-CS1	65.8

表 1 8 に示されるように、LAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。また、このIL-2R発現率はフィブロネクチンを固定化した培養器材を使用した群と比較しても高いものであった。すなわちLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、フィブロネクチンそのものよりも好適にIL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 1 8 LAK細胞におけるIL-2R発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例 13 - (2) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例 18 - (1) で誘導・培養した7日目のLAK細胞中におけるCD4細胞、CD8細胞表面上におけるIL-2R発現率の測定を実施例 9 - (2) に記載の方法に準じて行った。なお、今回の操作では1次抗体としてFITC標識マウス抗ヒトCD4抗体またはFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体を、2次抗体としてPE標識マウス抗ヒトIL-2R (CD25) 抗体を使用した。結果を表19に示す。

表 19

フィブロネクチン フラグメント	CD4/IL-2R二重陽性細胞 含有率 (%)	CD8/IL-2R二重陽性細胞 含有率 (%)
対照 (FNfr非固定化)	20.5	49.4
CH-296	41.2	61.6
C-CS1	24.4	54.6

表19に示されるように、LAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞 (CD4およびCD8陽性の両細胞) 表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわちLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、CD4およびCD8陽性の両細胞表面上のIL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 19 LAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例 13 - (2) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 19 - (1) で誘導・培養した 15 日目の LAK 細胞中における、CD8 陽性細胞含有比率の測定を実施例 1 - (4) に記載の方法に準じて行った。結果を表 20 に示す。

表 20

フィブロネクチンフラグメント	CD8/陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr非固定化)	42.9
CH-296	72.1
H-296	76.0

表 20 に示されるように、LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中の LAK 細胞中における CD8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK 細胞中の CD8 陽性細胞の含有率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 21 LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK 細胞の誘導および培養

5HXVIVO20 に $0.5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml となるように実施例 1 - (1) で調製した PBMC を懸濁後、実施例 13 - (1) で調製した抗ヒト CD3 抗体固定化プレート、または抗ヒト CD3 抗体および FNfr 固定化プレートに 1ml/ウェルずつまき、終濃度 1000U/ml となるように IL-2 (塩野義製薬社製) を添加した。これらの

プレートに5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目には1000U/mlのIL-2を含む5HXVIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜5HXVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始8または9日目には実施例13-(1)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ（ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mlとした）に適宜5HXVIVO20を用いて希釈した培養液を移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11日目または12日目に再度適宜5HXVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表21および表22に示す。表中においてdonorはPBMCドナーの記号を示す。

表 2 1

donor	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始8日目 刺激	拡大培養率 (倍率)
A	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	x 8 0
		抗CD3	抗CD3	x 3 8
	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	x 1 4 5 2
		抗CD3+CH-296	抗CD3	x 1 6 2 0
		抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	x 2 7 0 0
B	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	x 7 1 0
		抗CD3	抗CD3	x 2 3 6 3
	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	x 5 0 4
		抗CD3+CH-296	抗CD3	x 5 4 6 8
		抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	x 1 4 2 4 3
C	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	x 1 8 0 5
		抗CD3	抗CD3	x 4 2 0 0
	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	x 3 5 7 0 0
	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	x 1 6 9 5 0

表 2 2

donor	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	拡大培養率（倍率）
B	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	x 2 0 7 4
		抗CD3	抗CD3	x 2 8 8 0
	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	x 3 8 4 0 0
	CH-271	抗CD3+CH-271	抗CD3+CH-271	x 1 2 6 7 2
	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	x 6 7 5 8 4
	H-271	抗CD3+H-271	抗CD3+H-271	x 8 7 5 5
	C-274	抗CD3+C-274	抗CD3+C-274	x 8 5 2 5
	C-CS1	抗CD3+C-CS1	抗CD3+C-CS1	x 9 6 7 7
	CHV-90	抗CD3+CHV-90	抗CD3+CHV-90	x 1 0 1 3 8
	CHV-179	抗CD3+CHV-179	抗CD3+CHV-179	x 8 2 9 4
	CHV-181	抗CD3+CHV-181	抗CD3+CHV-181	x 5 7 6 0

表 2 1 および表 2 2 に示されるように、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、より高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 2 1 LAK細胞培養系における増殖率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例 20 - (1) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際の培養開始後 4 日目から 8 日目までの細胞の増殖率および培養開始後 11 日目から 15 日目までの細胞の増殖率を算出した。結果を表 23 および表 24 に示す。

表 23

donor	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始8日目 刺激	11~15日目までの 増殖率 (倍率)
A	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	6.7倍
		抗CD3	抗CD3	8.3倍
	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	2.6倍
		抗CD3+CH-296	抗CD3	5.5倍
		抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	11.1倍
B	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	7.4倍
		抗CD3	抗CD3	17.5倍
	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	0.9倍
		抗CD3+CH-296	抗CD3	19.8倍
		抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	60.3倍
C	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	5.2倍
		抗CD3	抗CD3	22.2倍
	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	94.0倍
	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	35.0倍

表 2 4

donor	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	11～15日目までの 増殖率（倍率）
B	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	5.7倍
		抗CD3	抗CD3	15.6倍
	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	55.6倍
	CH-271	抗CD3+CH-271	抗CD3+CH-271	25.0倍
	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	88.9倍
	H-271	抗CD3+H-271	抗CD3+H-271	23.8倍
	C-274	抗CD3+C-274	抗CD3+C-274	61.7倍
	C-CS1	抗CD3+C-CS1	抗CD3+C-CS1	28.0倍
	CHV-90	抗CD3+CHV-90	抗CD3+CHV-90	44.0倍
	CHV-179	抗CD3+CHV-179	抗CD3+CHV-179	32.7倍
	CHV-181	抗CD3+CHV-181	抗CD3+CHV-181	41.7倍

表 2 3 および表 2 4 に示されるように、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して誘導後期におけるLAK細胞の増殖率が高い。これらの増殖率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における誘導後期のLAK細胞の増殖率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、より高い増殖率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 2 2 L A K細胞におけるIL-2R発現の誘導

(1) L A K細胞の誘導および培養

実施例 20 - (1) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例 22 - (1) で誘導・培養後15日目のLAK細胞におけるIL-2R発現率の測定は実施例 2 - (2) に記載の方法に準じて行った。その結果を表 25 および表 26 に示す。かかる表においてはIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

表 25

フィブロネクチンフラグメント	培養開始0日目	培養開始9日目	IL-2R発現率(%)
	刺激	刺激	
対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	4.8
	抗CD3	抗CD3	32.6
CH-296	抗CD3+CH-296	なし	2.5
	抗CD3+CH-296	抗CD3	72.3
	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	94.7
H-296	抗CD3+H-296	なし	1.4
	抗CD3+H-296	抗CD3	50.2
	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	89.6

表 2 6

フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	IL-2R発現率(%)
対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	4.8
	抗CD3	抗CD3	18.0
CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	84.0
CH-271	抗CD3+CH-271	抗CD3+CH-271	67.1
H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	79.9
H-271	抗CD3+H-271	抗CD3+H-271	51.6
C-274	抗CD3+C-274	抗CD3+C-274	66.4
C-CS1	抗CD3+C-CS1	抗CD3+C-CS1	72.5
CHV-90	抗CD3+CHV-90	抗CD3+CHV-90	52.6
CHV-179	抗CD3+CHV-179	抗CD3+CHV-179	63.4
CHV-181	抗CD3+CHV-181	抗CD3+CHV-181	68.3

表 2 5 および表 2 6 に示されるように、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して培養開始15日目のLAK細胞表面上のIL-2R発現率が高い。これらのIL-2R発現率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群におけるIL-2R発現率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントを用いて刺激することにより、より高いIL-2R発現率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 2 3 L A K細胞におけるCD8陽性細胞比率の測定

(1) L A K細胞の誘導および培養

実施例 20 - (1) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

(2) LAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率の測定

実施例 23 - (1) で誘導・培養した15日目のLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率の測定は実施例 1 - (4) に記載の方法に準じて行った。その結果を表 27 に示す。

表 27

フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始8日目 刺激	CD8陽性細胞含有率 (%)
対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	42.9
	抗CD3	抗CD3	55.2
CH-296	抗CD3+CH296	なし	72.1
	抗CD3+CH296	抗CD3	85.2
	抗CD3+CH296	抗CD3+CH-296	75.9
H-296	抗CD3+H296	なし	76.0
	抗CD3+H296	抗CD3	82.0
	抗CD3+H296	抗CD3+H296	77.1

表 27 に示されるように、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して培養開始15日目のLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率が高い。これらのCD8陽性細胞含有比率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群におけるCD8陽性細胞含有比率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントを用いて刺激することにより、より高

いCD8陽性細胞含有比率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1 ; Partial region of fibronectin named III-8.

SEQ ID NO:2 ; Partial region of fibronectin named III-9.

SEQ ID NO:3 ; Partial region of fibronectin named III-10.

SEQ ID NO:4 ; Partial region of fibronectin named III-12.

SEQ ID NO:5 ; Partial region of fibronectin named III-13.

SEQ ID NO:6 ; Partial region of fibronectin named III-14.

SEQ ID NO:7 ; Partial region of fibronectin named CS-1.

SEQ ID NO:8 ; Fibronectin fragment named C-274.

SEQ ID NO:9 ; Fibronectin fragment named H-271.

SEQ ID NO:10 ; Fibronectin fragment named H-296.

SEQ ID NO:11 ; Fibronectin fragment named CH-271.

SEQ ID NO:12 ; Fibronectin fragment named CH-296.

SEQ ID NO:13 ; Fibronectin fragment named C-CS1.

SEQ ID NO:14 ; Fibronectin fragment named CHV-89.

SEQ ID NO:15 ; Fibronectin fragment named CHV-90.

SEQ ID NO:16 ; Fibronectin fragment named CHV-92.

SEQ ID NO:17 ; Fibronectin fragment named CHV-179.

SEQ ID NO:18 ; Fibronectin fragment named CHV-181.

SEQ ID NO:19 ; Fibronectin fragment named H-275-Cys.

SEQ ID NO:20 ; Primer 12S.

SEQ ID NO:21 ; Primer 14A.

SEQ ID NO:22 ; Primer Cys-A.

SEQ ID NO:23 ; Primer Cys-S.

SEQ ID NO:24 ; Designed peptide based on matrixprotein derived from influenza virus.

産業上の利用の可能性

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法によれば、細胞傷害活性が高く維持され、I L - 2 R の発現量が有意に上昇し、C D 8 陽性細胞の比率が向上した細胞傷害性リンパ球が得られる。当該リンパ球は、例えば、養子免疫療法に好適に使用される。従って、本発明の方法は、医療分野への多大な貢献が期待される。

請求の範囲

1. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法。
2. 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、インターロイキン-2レセプターを高発現するものである請求項1記載の方法。
3. 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、CD8陽性細胞を高比率で含有するものである請求項1記載の方法。
4. 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、細胞傷害活性が高く維持されたものである請求項1～3いずれか1項に記載の方法。
5. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固相に固定化されてなるものである請求項1～4いずれか1項に記載の方法。
6. 固相が細胞培養用器材または細胞培養用担体である請求項5記載の方法。

7. 細胞培養用器材がシャーレ、フラスコまたはバッグであり、細胞培養用担体がビーズ、メンブレンまたはスライドガラスである請求項6記載の方法。

8. 細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つをフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含む培地中で行なう請求項1～4いずれか1項に記載の方法。

9. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである請求項1～8いずれか1項に記載の方法。

10. フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである請求項9記載の方法。

11. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである請求項9記載の方法。

12. 細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中に行なう請求項1記載の方法であって、

(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、 $1 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ である、および

(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、 $1 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ で

ある、
のいずれかの条件を満たす方法。

13. 希釈する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含しない請求項12記載の方法。

14. 請求項1～13いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球。

15. 請求項1～13いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬。

16. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有することを特徴とする細胞のインターロイキン-2レセプター発現増強剤。

17. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである請求項16記載のインターロイキン-2レセプター発現増強剤。

18. フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである請求項17記載のインターロイキン-2レセプター発現増強剤。

19. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである請求項17記載のインターロイキン-2レセプター発現増強剤。

20. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有することを特徴とするリンパ球中のCD8陽性細胞の比率向上剤。

21. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである請求項20記載のCD8陽性細胞の比率向上剤。

22. フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである請求項21記載のCD8陽性細胞の比率向上剤。

23. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである請求項21記載のCD8陽性細胞の比率向上剤。

24. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有することを特徴とする細胞傷害性リンパ球における細胞傷害活性の向上剤または維持剤。

25. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである請求項24記載の細胞傷害活性の向上剤または維持剤。

26. フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである請求項25記載の細胞傷害活性の向上剤または維持剤。

27. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである請求項25記載の細胞傷害活性の向上剤または維持剤。

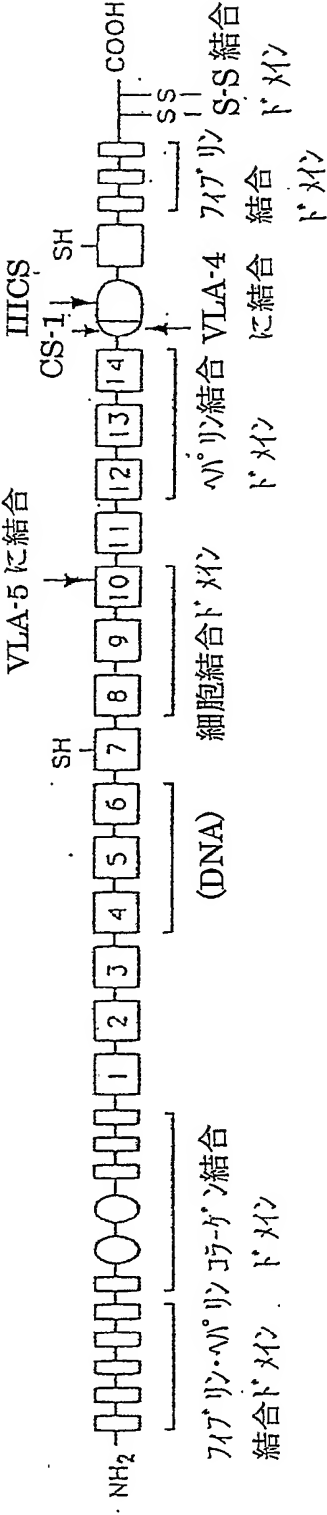
28. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含む、細胞傷害性リンパ球でのインターロイキン-2レセプターの発現を増大する方法。




29. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含む、細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率を向上する方法。

30. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう工程を含むことを特徴とする細胞傷害性リンパ球において細胞傷害活性を向上または維持させる方法。

31. 細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む請求項1～13いずれか1項に記載の方法。

32. 外来遺伝子をレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入する請求項31に記載の方法。



- I 型繰返し配列 
- II 型繰返し配列 
- III 型繰返し配列 

第 1 図

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Process for the preparation of lymphocyte having cytotoxic activity

<130> 03-021-PCT

<150> JP 2002-84414

<151> 2002-03-25

<160> 24

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-8

<400> 1

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr			
	80	85	

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-9

<400> 2

Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala			
1	5	10	15
Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr			
	20	25	30
Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro			
	35	40	45
Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr			

	50	55	60
Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu			
	65	70	75
Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr			
	80	85	90

<210> 3

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-10

<400> 3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg			
	20	25	30
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val			
	35	40	45
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser			
	50	55	60
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val			
	65	70	75
Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile			

80

85

90

Asn Tyr Arg Thr

<210> 4

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-12

<400> 4

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr

20 25 30

Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met

35 40 45

Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser

50 55 60

Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu

65 70 75

Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr

80 85 90

Leu Glu

<210> 5

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-13

<400> 5

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu

1 5 10 15

Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr

30 35 40

Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile

45 50 55

Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly

60 65 70

Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn

75 80 85

Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr

90 95

<210> 6

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-14

<400> 6

Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro
1				5					10					15
Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr
				20					25					30
Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu
				35					40					45
Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Thr
				50					55					60
Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu
				65					70					75
Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr
				80					85					90

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named CS-1

<400> 7

Asp	Glu	Leu	Pro	Gln	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His
1				5					10				15	
Gly	Pro	Glu	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Thr					
				20					25					

<210> 8

<211> 274

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> fibronectin fragment named C-274

<400> 8

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10				15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25				30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40				45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55				60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln

	65		70		75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp					
	80		85		90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe					
	95		100		105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg					
	110		115		120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp					
	125		130		135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr					
	140		145		150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg					
	155		160		165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp					
	170		175		180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu					
	185		190		195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg					
	200		205		210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe					
	215		220		225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys					
	230		235		240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg					
	245		250		255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg					

260

265

270

Thr Glu Ile Asp

<210> 9

<211> 271

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> fibronectin fragment named H-271

<400> 9

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro

1

5

10

15

Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr

20

25

30

Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met

35

40

45

Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser

50

55

60

Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu

65

70

75

Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr

80

85

90

Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala

	95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr			
	110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr			
	125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile			
	140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr			
	155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser			
	170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr			
	185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile			
	200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg			
	215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile			
	230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala			
	245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys			
	260	265	270
Thr			

<210> 10

<211> 296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-296

<400> 10

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr

20 25 30

Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met

35 40 45

Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser

50 55 60

Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu

65 70 75

Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr

80 85 90

Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala

95 100 105

Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr

110 115 120

Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr

125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile		
140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr		
155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser		
170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr		
185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile		
200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg		
215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile		
230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala		
245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys		
260	265	270
Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu		
275	280	285
His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr		
290	295	

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-271

<400> 11

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp			
	275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp			
	290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr			
	305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro			
	320	325	330

Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser		
455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser		
470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr		
485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg		
500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr		
515	520	525

Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser

530

535

540

Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr

545

<210> 12

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296

<400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20

25

30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35

40

45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50

55

60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65

70

75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		

	275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp			
	290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr			
	305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro			
	320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys			
	335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg			
	350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro			
	365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile			
	380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp			
	395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys			
	410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr			
	425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser			
	440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser			
	455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser			

470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr		
485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg		
500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr		
515	520	525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser		
530	535	540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu		
545	550	555
Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp		
560	565	570
Val Pro Ser Thr		

<210> 13

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named C-CS1

<400> 13

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			

200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr		
275	280	285
Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro		
290	295	300
Ser Thr		

<210> 14

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-89

<400> 14

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			

200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		
365		

<210> 15

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-90

<400> 15

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
	140	145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
	155	160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
	170	175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
	185	190 195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
	200	205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
	215	220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
	230	235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
	245	250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
	260	265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn		
	275	280 285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp		
	290	295 300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu		
	305	310 315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro		
	320	325 330

Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu
 335 340 345
 Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu
 350 355 360
 Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 365

<210> 16

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-92

<400> 16

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		

260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala	Ile Pro Ala Pro Thr Asp	
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr	Ser Leu Ser Ala Gln Trp	
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly	Tyr Arg Val Arg Val Thr	
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys	Glu Ile Asn Leu Ala Pro	
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly	Leu Met Val Ala Thr Lys	
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys	Asp Thr Leu Thr Ser Arg	
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu	Glu	
365	370	

<210> 17

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-179

<400> 17

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
	200	205 210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
	215	220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
	230	235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
	245	250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
	260	265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
	275	280 285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
	290	295 300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
	305	310 315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
	320	325 330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
	335	340 345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
	350	355 360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu		
	365	370 375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln		
	380	385 390

	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			

230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		

	425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser			
	440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr			
	455		

<210> 19

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-275-Cys

<400> 19

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr			
1	5	10	15
Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn			
	20	25	30
Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys			
	35	40	45
Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser			
	50	55	60
Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser			
	65	70	75

Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly		
	80	85 90
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg		
	95	100 105
Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr		
	110	115 120
Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala		
	125	130 135
Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg		
	140	145 150
Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile		
	155	160 165
Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val		
	170	175 180
Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe		
	185	190 195
Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro		
	200	205 210
Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly		
	215	220 225
Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr		
	230	235 240
Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile		
	245	250 255
Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile		
	260	265 270

Gly Arg Lys Lys Thr Cys

275

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 12S

<400> 20

aaacctggc agctagcgct attcctgcac caactgac

38

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 14A

<400> 21

aaaggatccc taactagtct ttttccttcc aatcag

36

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-A

<400> 22

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatgggtct gtttcctgtg 40

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-S

<400> 23

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c 41

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed peptide based on matrixprotein derived from influenza virus

<400> 24

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/02, A61K35/14, A61P31/04, A61P35/00, A61P37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/02, A61K35/14, A61P31/04, A61P35/00, A61P37/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89/01942 A1 (Regents of the University of Minnesota), 09 March, 1989 (09.03.89), & EP 366728 A1 & US 5019646 A & JP 3-500046 A	1-32
A	JP 4-297494 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 21 October, 1992 (21.10.92), (Family: none)	1-32
A	JP 6-306096 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 01 November, 1994 (01.11.94), (Family: none)	1-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
18 June, 2003 (18.06.03)

Date of mailing of the international search report
01 July, 2003 (01.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03575

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-314183 A (Japan Science and Technology Corp.), 13 November, 2001 (13.11.01), (Family: none)	1-32

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/02, A61K35/14, A61P31/04, A61P35/00,
A61P37/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/02, A61K35/14, A61P31/04, A61P35/00,
A61P37/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 89/01942 A1 (リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティー・オブ・ミネソタ) 1989.03.09 & EP 366728 A1 & US 5019646 A & JP 3-500046 A	1-32
A	JP 4-297494 A (富士写真フイルム株式会社) 1992.10.21 (ファミリーなし)	1-32
A	JP 6-306096 A (富士写真フイルム株式会社) 1994.11.01 (ファミリーなし)	1-32

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.06.03

国際調査報告の発送日

01.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-314183 A(科学技術振興事業団) 2001. 11. 13 (ファミリーなし)	1 - 3 2